

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Saša Janjanin

**Izolacija i karakterizacija
mezenhimskih matičnih stanica iz
nepčanih tonzila**

DISERTACIJA

Zagreb, 2009.

Pokusi u sklopu ovog istraživanja obavljani su pod vodstvom dr. Rocky Tuan-a u Cartilage Biology and Orthopaedics Branch, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health u Bethesda, SAD.

Moj rad je omogućen sredstvima za intramuralna istraživanja National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health (Grant ZO1 41131), te Fulbrightovom stipendijom (the U.S. Department of State).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Drago Prgomet

Bez pomoći dragih ljudi ne bi bilo niti ove disertacije, te im ovom prilikom iskreno zahvaljujem – ne samo dolje navedenima, nego svima koji su neposredno ili posredno utjecali na izradu ovog doktorata...

Prof. dr. Slobodan Vukičević mi je - pored preporuke za Fulbrightovu stipendiju - omogućio i prve istraživačke korake u svom laboratoriju. Ravnateljstvo KBC Zagreb omogućilo mi je mirovanje specijalizacije za vrijeme boravka u SAD.

Dane provedene u NIH i prijatelje koje sam tamo stekao nikada neću zaboraviti. Veliko hvala dr. Rocky Tuan-u, pročelniku laboratorija i divnom mentoru, velikom znanstveniku i intelektualcu. Veliko hvala i dr. Faridi Djouad, dr. Rabie Shanti-u, dr. Dolores Baksh i svim ostalim članovima Cartilage Biology and Orthopaedic Branch-a i George Washington University-a koji su sudjelovali u istraživanju, ali i uvijek bili spremni na poticajnu raspravu i nesebične savjete vezane uz ovaj projekt.

Osobitu zahvalu dugujem svom mentoru prof. dr. Dragi Prgometu za razumijevanje i pomoć pri produženju boravka u NIH, a kasnije i za brojne savjete i vođenje pri izradi ove disertacije.

Naposljetku, hvala i mojim roditeljima na bezrezervnoj podršci koju su mi pružali svih ovih godina...

Idi i Lei, zato što sam s njima sretan.

SADRŽAJ

Kratice upotrebljene u disertaciji	1
1. Uvod	2
1.1. Mezenhimske matične stanice (MMS)	2
1.2. Obilježja MMS u staničnoj kulturi	3
1.3. Fenotipska obilježja MMS	4
1.4. Diferencijacijska svojstva MMS	5
1.5. Imuna svojstva MMS	7
1.6. Alternativni izvori MMS	7
1.7. Klinička primjena MMS	8
1.7.1. Lokalna implantacija MMS	9
1.7.2. Sistemska transplantacija MMS	9
1.7.3. Kombinacija terapije MMS i genske terapije	10
1.7.4. MMS u tkivnom inženjerstvu	10
1.8. Uvod u istraživanje disertacije	11
2. Hipoteza i ciljevi istraživanja	13
2.1. Hipoteza	13
2.2. Ciljevi istraživanja	13
3. Materijali i metode	14
3.1. Izolacija tonzilarnih MMS (T-MMS)	14
3.2. Izolacija MMS iz koštane srži	16
3.3. Ekspanzija stanica	16
3.4. Karakterizacija kinetike rasta MMS i ponašanja u kulturi	17
3.5. Karakterizacija površinskih epitopa MMS	18
3.5.1. Imunofluorescencija uz analizu konfokalnim mikroskopom	19
3.5.2. Protočna citometrija	20
3.6. In vitro diferencijacija MMS	21
3.7. Analiza diferencijacijskih biljega pomoću RT-PCR	23

3.8. Kvantitativna (<i>real-time</i>) PCR analiza razine ekspresije specifičnih diferencijacijskih biljega	24
3.9. Histološka i histokemijska analiza diferencijacije	26
3.9.1. <i>Oil red O</i> bojenje	26
3.9.2. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze	26
3.9.3. <i>Alizarin red S</i> bojenje	27
3.9.4. <i>Alcian blue</i> bojenje	27
3.10. Statistička analiza prikupljenih podataka	28
4. Rezultati	29
4.1. Morfologija T-MMS	29
4.2. Proliferativni potencijal T-MMS	32
4.3. Sposobnost stvaranja kolonija	32
4.4. Imunofluorescencija i analiza protočnom citometrijom	35
4.5. Adipogeni potencijal	39
4.6. Osteogeni potencijal	40
4.7. Hondrogeni potencijal.....	44
4.8. <i>In vitro</i> indukcija diferencijacije je specifična za staničnu lozu	44
5. Rasprava	46
6. Zaključci	59
7. Sažetak	60
8. Summary	62
9. Literatura	64
10. Životopis	73

KRATICE UPOTREBLJENE U DISERTACIJI:

AGN	agrekan
ALP	alkalna fosfataza
APC	alofikocijanin
cDNA	komplementarna DNA
COL1A2	kolagen tipa I α 2
COL2A1	kolagen tipa II α 1
COL9	kolagen tipa IX
Ct	broj polimerizacijskih ciklusa potrebnih da se zamijeti fluorescentni signal u kvantitativnoj PCR analizi, prema engl. <i>cycle threshold</i>
DMEM	Eagleov medij modificiran po Dulbeccu, prema engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
FBS	fetalni bovini serum
FITC	fluorescein izotiocijanat
FPO	fosfatna puferska otopina, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, tzv. <i>housekeeping</i> gen
IBMX	izobutilmetilksantin
KLSM	konfokalni laserski skenirajući mikroskop
KS-MMS	mezenhimske matične stanice izolirane iz koštane srži, koštane MMS
LPL	lipoproteinska lipaza
MHC	kompleks glavnih antigena tkivne podudarnosti, prema engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MMS	mezenhimske matične stanice
OC	osteokalcin
PE	fikoeritrin
PPARγ	peroksisomski proliferator-aktivirajući receptor- γ
RNA	ribonukleinska kiselina
RT-PCR	<i>reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>
T-MMS	mezenhimske matične stanice izolirane iz tonzila, tonzilarne MMS
TGF	transformirajući čimbenik rasta, prema engl. <i>transforming growth factor</i>
TNFα	čimbenik tumorske nekroze- α , prema engl. <i>tumor necrosis factor-α</i>

1. UVOD

1.1. Mezenhimske matične stanice

Osnovne značajke matičnih stanica su velika mogućnost samoobnavljanja, sposobnost diferencijacije u više različitih staničnih loza i klonalnost¹, pri čemu su klonalne one stanice koje umnožavanjem daju genetički identične stanice, od kojih se pak svaka u odgovarajućim uvjetima može razviti i u različite diferencirane stanice. Različite vrste matičnih stanica su u organizmu raspoređene na različitim hijerarhijskim razinama i nalaze se u pojedinim stadijima razvoja organizma. Matične stanice koje se mogu razviti u bilo koju vrstu stanica, primjer kojih su fertilizirani oociti ili neke embrijske matične stanice, nazivamo totipotentnim matičnim stanicama. Druge vrste matičnih stanica mogu se razviti samo u ograničen broj, odnosno odgovarajuću skupinu zrelih, diferenciranih stanica. Takve stanice nazivamo multipotentnim, odnosno pluripotentnim matičnim stanicama².

Mezenhimske matične stanice (MMS) su multipotentne matične stanice podrijetlom iz odraslih tkiva, koje se u najvećem broju nalaze u stromi koštane srži³, ali i u drugim organima i tkivima. Njihova značajka je sposobnost diferencijacije u različita tkiva mezodermalnog podrijetla, uključujući kost, hrskavicu, masno i mišićno tkivo⁴. Prvi istraživači koji su izolirali MMS iz koštane srži bili su Friedenstein i sur.⁵, koji su 1976. godine kultivirali koštanu srž u plastičnim posudama za staničnu kulturu, te nakon 4 sata odstranili stanice koje nisu prionule za dno posuda. Na taj su se način riješili hematopoetskih stanica (koje ne prijanjaju), što je danas jedan od standardnih koraka u protokolima izolacije MMS. Friedenstein i suradnici su primijetili da su adherentne

stanice morfološki heterogene, da najadherentnije stanice imaju vretenast oblik i stvaraju nakupine od 2-4 stanice, te da se nakon početne neaktivnosti u trajanju od desetak dana započinju umnožavati. Nakon nekoliko dioba u kulturi stanice su postale morfološki homogenije i nalik fibroblastima. Nadalje, u kolonijama tih stanica povremeno bi se pronašle nakupine hrskavice ili kosti.

Tijekom 1980.-ih Friedensteinova opažanja je razradilo nekoliko timova koji su potvrdili da su stanice koštane srži izolirane tom metodom multipotentne, tj. da se mogu diferencirati u osteoblaste, hondroците, adipocyte, pa čak i mioblaste^{6,7}. Nadalje, utvrđeno je da se diferencijacija tih stanica u mezenhimska tkiva odvija na klonskoj razini^{4,8}, čime su zadovoljeni uvjeti da se one okarakteriziraju kao matične stanice. To je 1994. godine prvi učinio Arnold Caplan⁹. Danas se one nazivaju multipotentnim MMS, odnosno mezenhimskim progenitorskim stanicama zbog njihove sposobnosti da se diferenciraju u različite stanice mezenhimskog podrijetla.

1.2. Obilježja MMS u staničnoj kulturi

Humane MMS se za istraživačke i terapijske svrhe najčešće izoliraju iz mononuklearnog sloja koštane srži nakon njihova odvajanja na gradijentu gustoće¹⁰. Mononuklearne stanice se kultiviraju u mediju obogaćenom s 10% fetalnog bovinog seruma, pri čemu u staničnoj kulturi prijanjaju za dna posuda. Zamijećeno je da mali broj hematopoetskih stanica (uglavnom monociti) također može prijanjati, no analize površinskih biljega su pokazale da te stanice s vremenom nestanu s promjenama medija i ekspanzijom, tako da u kulturama preostanu samo MMS. MMS u kulturi nalikuju

fibroblastima – vretenastog su oblika s nekoliko tankih produljenih izdanaka citoplazme i s okruglim, centralno smještenim jezgrama¹¹. Nakon 7-10 dana od početka inkubacije do početka diobe stanica (engl. *lag phase*), MMS se započinju brzo dijeliti, pri čemu vrijeme udvostručenja populacije značajno ovisi o davatelju i inicijalnoj gustoći kultiviranja. Dosadašnje brojne studije pokazale su da proliferacijski i diferencijacijski potencijal mezenhimskih matičnih stanica opada s povećanjem dobi davatelja^{12,13}.

Analize kulture pune koštane srži pokazale su da su MMS slabo zastupljena populacija stanica koja sačinjava između 0,001% i 0,01% nukleiranih stanica koštane srži, dakle, ima ih desetak puta manje od hematopoetskih matičnih stanica. Ipak, MMS se *in vitro* mogu lako klonski umnožiti (moguće je ostvariti oko 40 dioba u kulturi, uz povećanje broja stanica za više od milijun puta od početnog), pri čemu zadržavaju sposobnost diferencijacije u različite mezenhimske stanične linije^{4,14,15}. Još uvijek nisu pronađeni *in vitro* uvjeti koji bi omogućili neograničenu diobu MMS, no današnjim metodama stanične kulture moguće je uzgojiti milijarde MMS iz malene količine aspirata koštane srži¹⁶.

1.3. Fenotipska obilježja MMS

Na površini MMS izraženi su brojni biljezi od kojih, nažalost, niti jedan nije specifičan za MMS. Brojnim istraživanjima potvrđeno je da se na površini odraslih MMS ne nalaze hematopoetski biljezi CD45, CD34, CD14 ili CD11. Također, na površini MMS se nikad ne nalaze kostimulacijske molekule CD80, CD86 i CD40, te adhezijske molekule CD31 (engl. *platelet/endothelial cell adhesion molecule* [PECAM]-1), CD18 (engl. *leukocyte function-associated antigen-1* [LFA-1]) i CD56 (adhezijska molekula

neuronskih stanica). S druge strane, na površini MMS mogu se naći biljezi CD105 (endoglin, SH2), CD73 (SH3/4), CD44 (hijaluronski receptor), CD90 (antigen timusnih stanica, Thy-1), CD71 i Stro-1, kao i adhezijske molekule CD106 (engl. *vascular cell adhesion molecule* [VCAM]-1), CD166 (engl. *activated leukocyte cell adhesion molecule* [ALCAM]), međustanična adhezijska molekula (engl. *intercellular adhesion molecule* [ICAM]-1) i CD29 (β 1-integrin)¹⁷⁻²⁰. Također, za MMS je znakovito da na površini imaju umjereno izražene molekule MHC I razreda, ali ne i molekule MHC II razreda²¹.

Zbog raznovrsnih i neujednačenih kriterija i biljega koji su se u posljednjih nekoliko godina upotrebljavali u karakterizaciji MMS, članovi Međunarodnog društva za staničnu terapiju (*The International Society for Cellular Therapy, ISCT*) nedavno su predložili smjernice. Tri predložena identifikacijska kriterija su: (1) adherentnost u kulturi stanica, (2) *in vitro* dokazana adipogena, osteogena i hondrogena diferencijacija (o čemu će biti više riječi u slijedećem odlomku), te (3) više od 95% stanica pozitivno na CD105, CD73 i CD90, te manje od 2% pozitivnih stanica na biljege CD45, CD34, CD14 i HLA-DR²². Članovi Društva su uveli ove smjernice radi ujednačavanja znanstvene komunikacije te doprinosa daljnjem istraživanju MMS.

1.4. Diferencijacijska svojstva MMS

Uz karakterizaciju MMS na temelju njihovih morfoloških i fenotipskih obilježja, najvažniji kriterij identifikacije MMS je njihova sposobnost da se u odgovarajućim uvjetima diferenciraju u koštane, hrskavične i masne stanice. Standardna metoda diferencijacije MMS u osteoblaste temelji se na kultiviranju konfluentnog monosloja MMS u mediju s dodatkom β -glicerol-fosfata, deksametazona, askorbične kiseline i

vitamina D3. Tako inducirane MMS stvaraju agregate ili nodule s pojačanom aktivnošću enzima alkalne fosfataze, a s vremenom se u kulturi mogu vidjeti i nakupine kalcija⁴. Koštani se noduli histološki pozitivno boje pomoću Alizarin red S ili von Kossa bojama.

Da bi se u kulturama potakla adipogena diferencijacija, MMS se inkubiraju s deksametazonom, izobutilmetilksantinom i inzulinom. Već nakon nekoliko dana se unutar tih stanica može opaziti nakupljanje lipidnih vakuola, a metodama molekularne analize može se ustanoviti ekspresija peroksisomskog proliferator-aktivirajućeg receptora- γ i lipoproteinske lipaze⁴. Nakon nekoliko tjedana lipidne vakuole se međusobno spajaju i u potpunosti ispunjavaju stanice. Nakupljanje lipida u induciranim MMS histološki se dokazuje bojenjem pomoću Oil red O.

Za uspješan proces hondrogeneze MMS je potrebno inkubirati u posebnim trodimenzionalnim konformacijama, za razliku od monosloja potrebnog za poticanje osteogeneze i adipogeneze. Neki od danas najčešće rabljenih modela trodimenzionalne inkubacije su: (1) «micromass» kultura kojom se stvaraju adherentni kuglasti agregati MMS koji se uzgajaju u tradicionalnim polistirenskim posudama za staničnu kulturu²³; (2) «pellet» model hondrogeneze u kojem se u polipropilenskim (neadherirajućim) tubama centrifugiranjem formiraju kuglaste formacije MMS (engl. *pellets*) koje slobodno lebde u diferencijacijskom mediju²⁴, te (3) uporaba biorazgradivih nosača (engl. *scaffolds*) na kojima se uzgajaju i diferenciraju MMS koje pritom preuzimaju trodimenzionalni oblik nosača²⁵. Za uspješno poticanje hondrogeneze stanice je potrebno inkubirati u mediju s dodatkom čimbenika rasta TGF²⁶. U takvim uvjetima trodimenzionalne kulture MMS morfološki se pretvaraju u višeslojne stanične nakupine

bogate matriksom, što se histološki dokazuje bojenjem pomoću Alcian blue koja se specifično veže na glikozaminoglikane u međustaničnom prostoru²⁷. Inducirane stanice također proizvode i kolagen tipa II koji je znakovit za hijalinu hrskavicu⁴.

1.5. Imuna svojstva MMS

Smatra se da antigeni na površini MMS ne izazivaju pojačani imuni odgovor (u člancima o imunim obilježjima MMS često se navodi slijedeći profil biljega: MHC I⁺, MHC II⁻, CD40⁻, CD80⁻, CD86⁻). Stoga dosadašnje transplantacije MMS u alogenih primatelja nisu zahtijevale imunosupresiju. Naime, same MHC molekule I. razreda (bez MHC molekula II. razreda) mogu aktivirati T-stanice, ali u odsutnosti kostimulacijskih molekula ne nastaju sekundarni signali, te T-stanice ne izazvaju daljnju imunu reakciju²⁸.

U brojnim radovima opisana su i imunosupresijska svojstva MMS, pri čemu je najznačajnija mogućnost supresije funkcije T-stanica^{29,30}. Neki autori smatraju da je za supresiju odgovoran izravni međustanični kontakt³¹, dok su ostali pokazali da supresijska aktivnost ovisi o raznim posrednicima^{29,32}. Nadalje, dio imunomodulacijskih svojstava MMS proizlazi iz njihove mogućnosti da usporavaju sazrijevanje i remete funkciju dendritičnih stanica, te inhibiraju rast, diferencijaciju i kemotaksiju B-stanica³³⁻³⁶.

1.6. Alternativni izvori MMS

Danas se za istraživačke i terapijske svrhe MMS najčešće izoliraju iz koštane srži^{37,38}. Iako je riječ o rutinskim bolničkim zahvatima, aspiracija i biopsija koštane srži su invazivni postupci praćeni stanovitim komplikacijama i rizicima³⁹. Također, broj MMS u koštanoj srži, njihova brzina rasta u kulturi i diferencijacijski potencijal smanjuju

se s povećanjem dobi davatelja¹². Stoga je razumljivo da je identifikacija potencijalnih alternativnih izvora MMS te izvora mlađih MMS jedan od glavnih interesa istraživača koji se bave staničnom terapijom⁴⁰.

Do danas su MMS uspješno izolirane iz brojnih odraslih i prenatalnih tkiva. De Bari i sur. su 2001. izolirali multipotentne mezenhimske stanice iz enzimski razgrađenih sinovijalnih membrana koljenskih zglobova⁴¹. Godinu dana kasnije, Zuk i sur. su izolirali MMS iz potkožnog abdominalnog masnog tkiva dobivenog liposukcijom, što se smatra jednim od najatraktivnijih i najdostupnijih alternativnih izvora MMS⁴². Iste su godine Noth i sur. dokazali uspješnu mezenhimsku diferencijaciju stanica izoliranih iz fragmenata trabekularne kosti koje su prethodno tretirali kolagenazama⁴³. Uslijedila je uspješna izolacija i karakterizacija MMS iz potkožnog tkiva mekog oglavka⁴⁴, timusa⁴⁵ i zubnog ligamenta⁴⁶. Od prenatalnih tkiva, MMS su uspješno izolirane iz pupčane krvi⁴⁷, pupčane vrpce⁴⁸ te placente⁴⁹.

1.7. Klinička primjena MMS

Zbog jednostavne izolacije, brzog rasta u staničnoj kulturi, sposobnosti samoobnavljanja, povoljnih imunih obilježja i sposobnosti multipotentne diferencijacije MMS su u posljednjih desetak godina osnovica brojnih istraživanja koja se bave razvojem novih, staničnih vrsta terapije te nove biomedicinske grane – regenerativne medicine. Od novih se medicinskih grana očekuje pronalazak boljih rješenja za presađivanje stanica ili organa te liječenje brojnih degenerativnih i starosnih promjena za koje danas ne postoji specifična terapija⁵⁰. Koncept terapije matičnim stanicama zasniva se na mobilizaciji postojećih matičnih stanica unutar organizma te presađivanju

autolognih ili alogenih matičnih stanica u primatelja. Specifične terapijske primjene MMS mogu se razvrstati u četiri osnovna područja: lokalna implantacija za lokalizirane bolesti, sistemska transplantacija, kombinacija terapije matičnim stanicama i genske terapije te uporaba MMS u tkivnom inženjerstvu⁵¹.

1.7.1. Lokalna implantacija MMS

Dosada je u više studija na životinjama zabilježena učinkovitost primjene MMS u liječenju koštanih defekata^{52,53}. Također postoje klinički prikazi bolesnika s poremećajima cijeljenja velikih koštanih defekata kojima su uspješno injicirane autologne MMS⁵⁴. Orlic i sur. su na mišjem modelu uspješno regenerirali miokard lokalno apliciranim MMS⁵⁵. MMS podrijetlom iz koštane srži kasnije su injicirane i u bolesnika s infarktom miokarda^{16,56}. MMS su upotrebljene i kao pomoć pri spinalnoj fuziji⁵⁷, reparaciji kraniotomijskih defekata⁵⁸ te reparaciji fokalnih defekata artikularne hrskavice^{59,60}, tetiva⁶¹ i meniskusa⁶². Injicirane MMS dobro se podnose i u nekim radovima su prikazani vrlo impresivni rezultati. Ipak, još nisu provedena randomizirana klinička ispitivanja koja bi te rezultate potvrdila na dovoljnom broju bolesnika.

1.7.2. Sistemska transplantacija MMS

Dokazi o hipoimunogenim i imunosupresivnim odlikama MMS povod su ideji o terapijskoj primjeni alogenih, tj. nekompatibilnih donorskih MMS³². Sistemska transplantacija alogenim MMS u djece s *osteogenesis imperfecta* rezultirala je prihvaćanjem donorskih stanica i stvaranjem nove kosti⁶³. Infuzija alogenih MMS u bolesnika s Hurlerovim sindromom ili metakromatskom leukodistrofijom također je dala

dobre rezultate i nije izazvala aktivaciju aloreaktivnih T stanica niti pojavu *graft-vs-host* reakcije⁶⁴. Alogene MMS prihvaćene su i u bolesnika s teškom idiopatskom aplastičnom anemijom⁶⁵. Imuna obilježja potakla su kliničare da upotrebe MMS i prilikom alogene transplantacije hematopoetskih matičnih stanica u prevenciji *graft-vs-host* reakcije, što je jedna od najozbiljnijih nuspojava toga zahvata⁶⁶⁻⁶⁸.

1.7.3. Kombinacija terapije MMS i genske terapije

Genetski modificirane matične stanice privlačan su cilj istraživača koji se bave razvojem genske terapije zbog brzog umnožavanja matičnih stanica i dugotrajnog održavanja u domaćinu. Genetski promijenjene MMS mogu stvarati i izlučivati egzogene proteine, poput faktora VIII i interleukina-3, te zadržavaju tu sposobnost i nakon transplantacije *in vivo*^{69,70}. Buduća istraživanja trebala bi pokazati mogućnost terapije temeljene na genetski modificiranim MMS.

1.7.4. MMS u tkivnom inženjstvu

Tkivnim inženjstvom se na alternativan način mogu stvoriti tkiva ili organi za transplantaciju koji dosad nisu bili dostupni zbog nedostatnog broja davatelja ili transplantacijskih ograničenja poput imunog odbacivanja ili neslaganja u veličini organa. Tkivno inženjstvo zasniva se na uporabi malog komada davateljevog tkiva iz kojeg se izoliraju željene stanice koje se *in vitro* umnožavaju do klinički potrebnog broja stanica. Potom se te stanice uz dodatak odgovarajućih bioaktivnih čimbenika kultiviraju u željenom obliku novog tkiva ili organa, koji se potom presađuje u davatelja. Zbog jednostavne izolacije, brzog razmnožavanja i multipotentnosti MMS su vrlo privlačne za

primjenu u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji skeletnih tkiva. Brojni *in vitro* i *in vivo* eksperimenti posljednjih nekoliko godina su pokazali mogućnosti diferencijacije i oblikovanja MMS u donorska tkiva. Tako je u literaturi opisano uspješno tkivno inženjerstvo Ahilove tetive⁷¹, segmentalnih defekata dugih kostiju⁷², postresekcijskog segmentalnog defekta tankog crijeva⁷³, srčanih valvula⁷⁴, tetive kvadricepsa⁷⁵, intervertebralnih diskova⁷⁶, prednjeg križnog ligamenta koljena⁷⁷, artikularne hrskavice⁷⁸ i hrskavice nosa²⁵. U idućim se godinama očekuje značajnija ekspanzija kliničkih ispitivanja primjene MMS u tkivnom inženjerstvu, poput nedavne rekonstrukcije mandibularnog defekta MMS i titanskom mrežicom natopljenom BMP-7⁷⁹.

1.8. Uvod u istraživanje disertacije

U eksperimentalnom radu disertacije istražena je mogućnost izolacije MMS iz nepčanih tonzila. Nepčane su tonzile parni limfatični organi koji se nalaze u prednjem i lateralnom dijelu orofarinksa. Tonzilarni epitel razvija se od stanica druge škržne vreće (endodermalnog podrijetla), a tijekom fetalnog razdoblja u njega migrira limfoidno tkivo mezodermalnog podrijetla. Dakle, embriološki, nepčane tonzile sadrže veći dio mezenhimske osnove, na temelju čega se pretpostavilo da bi mogle sadržavati i MMS. Kirurški su nepčane tonzile lako dostupne i u slučaju potrebe za manjom količinom tkiva tonzilarna biopsija (tonzilotomija) se može jednostavno obaviti pod lokalnom anestezijom bez većih komplikacija.

Tonzilektomija je kirurški zahvat pri kojem se u potpunosti odstranjuju obje nepčane tonzile. Danas su najčešće indikacije za tonzilektomiju recidivirajuće akutne

upale tonzila, epizode peritonzilarnog apscesa, sindroma apneje u snu (*sleep apnea*), intenzivno hrkanje zbog tonzilarne hipertrofije te poteškoće pri hranjenju ili gutanju zbog hipertrofije tonzila⁸⁰. Dok su zdrave tonzile u organizmu dio sekundarnog imunog sustava, kronično oboljele tonzile su manje učinkovite u obrambenoj funkciji. Točan učinak tonzilektomije na funkciju imunog sustava još nije u cijelosti poznat, no taj kirurški zahvat je najčešće izvođen kirurški zahvat u djece te među deset najčešće izvođenih kirurških zahvata u odraslih osoba. Krajem 1990.-ih u SAD se na godinu izvodilo oko 600.000 tonzilektomija (što je 3 puta manje nego početkom 1970.-ih!), što je činilo oko 1/7 ukupnih otorinolaringoloških zahvata. Većina njih (70%) izvedena je u djece⁸¹.

Podaci o velikom broju tonzilektomija govore u prilog značajnoj količini lako dostupnog “kirurškog viška” – uglavnom od osoba mlađe životne dobi – koji bi se mogao iskoristiti kao potencijalni alternativni izvor MMS. Cilj ove disertacije bio je utvrditi postojanje MMS u nepčanim tonzilama i ispitati njihovu sposobnost diferencijacije u tkiva mezodermalnog podrijetla.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Nepčane tonzile sadrže MMS koje se mogu uspješno izolirati upotrebom ili modifikacijom postojećih protokola za izolaciju MMS iz drugih tkiva i umnožiti *in vitro* uporabom standardnih tehnika stanične kulture. MMS podrijetlom iz nepčanih tonzila imaju multidiferencijacijski potencijal (sposobnost pretvaranja u različita mezodermalna tkiva – koštano, hrskavično i masno) te pokazuju fenotipska obilježja i osobine u staničnoj kulturi usporedive s MMS podrijetlom iz koštane srži.

2.2. Ciljevi istraživanja:

- (1) utvrditi postojanje mezenhimskih matičnih stanica u nepčanim tonzilama;
- (2) definirati izolacijske i ekspanzijske protokole za te stanice;
- (3) karakterizirati kinetiku rasta MMS iz tonzila te njihovo ponašanje u kulturi stanica *in vitro*;
- (4) istražiti i definirati specifične biljege na površini tih stanica metodama imunofluorescencije i konfokalne laserske mikroskopije te protočne citometrije;
- (5) ispitati sposobnost diferencijacije MMS iz tonzila u tkiva mezodermalnog podrijetla (hrskavično, koštano i masno);
- (6) usporediti značajke, biljege i diferencijacijski potencijal MMS iz nepčanih tonzila s dobro poznatom i karakteriziranom populacijom MMS podrijetlom iz koštane srži.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izolacija tonzilarnih MMS

Uz prethodno odobrenje Etičkog povjerenstva, tonzilarne MMS (T-MMS) su izolirane iz nepčanih tonzila 20 bolesnika (u dobi od 4-15 godina; prosjek godina 6) kod kojih je tonzilektomija izvršena zbog recidivirajućih akutnih upala grla. Sve su tonzilektomije izvršene u općoj anesteziji, tupom diskecijom “hladnim” kirurškim instrumentima.

Neposredno nakon tonzilektomije tonzile su u laboratorij dostavljene u sterilnim plastičnim posudama s Eagleovim medijem modificiranim po Dulbeccu (DMEM, engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; BioWhittaker, Walkersville, MD, SAD) s 250 µg/mL gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 250 IU/mL penicilina (Cellgro, Herndon, VA, SAD) i 1.5 µg/mL amfotericina B (Sigma-Aldrich). Unutar 6 sati od kirurškog zahvata nepčane tonzile se u laboratoriju deepiteliziraju uz pomoć skalpela, a potom pomoću sterilnih škarića usitne na komadiće. Zatim se u Erlenmayerovoj posudi kroz 30 minuta na 37 °C provede digestija komadića tkiva u RPMI mediju (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD) s 210 IU/mL kolagenaze tipa I (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, SAD) i 90 IU/mL DNaze (Sigma-Aldrich). Filtracijom digestirane suspenzije kroz žičane filtre odstrani se višak tkiva koji se digestijom nije razgradio na stanice. Filtrat se ispere kroz 10 minuta centrifugiranjem u 20% RPMI mediju pri 1500 okretaja u minuti. Potom se talog stanica ispere s 10% RPMI medijem i ponovi

centrifugiranje u trajanju od 10 minuta pri istom broju okretaja. Supernatant se nakon centrifugiranja odbaci, talog stanica resuspendira u 50 mL fosfatne puferske otopine (FPO, engl. *Phosphate Buffered Saline*, Gibco BRL), te se nakon razrjeđenja suspenzija rasporedi u 5 polipropilenskih kušalica, po 10 mL stanične suspenzije u svaku kušalicu. Potom se u svaku kušalicu alikvotira po 10 mL Ficoll-Paque otopine (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, SAD), ali tako da se sloj Ficoll-Paquea nakon alikvotiranja nalazi ispod sloja stanične suspenzije. To se čini opreznim prolaskom pipetom kroza sloj stanične suspenzije i polaganim titriranjem Ficoll-Paque otopine uz dno kušalice. Kušalice se centrifugiraju 25 minuta na temperaturi od 24 °C pri 1500 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja u sredini kušalice vidljiv je bijeli sloj mononuklearnih stanica, čiji se donji dio oprezno aspirira pipetom i potom ispere dva puta u FPO. Isprani aspirat mononuklearnih stanica potom se kultivira u polistirenskim posudama za kulturu stanica površine 150 cm² (T-150, engl. *tissue culture flask*, Corning, NY, SAD). Medij za kulturu stanica (ekspanzijski medij) sastoji se od DMEM u kojem se nalazi 10% fetalnog bovinog seruma (FBS; Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD), 250 µg/mL gentamicina, 250 IU/mL penicilina i 1.5 µg/mL amfotericina B. Nakon 24-48 sati stanice koje nisu prionule za dno posuda za tkivnu kulturu se odstrane iz kulture serijskim ispiranjem pomoću FPO. Time se odstrane limfocitne i epitelne stanice, a u kulturi ostaju stanice nalik fibroblastima (tj. T-MMS) i okrugle adherentne stanice (monociti koji se kasnije odstrane iz kulture tripsinizacijom, vidi pod «Ekspanzija stanica»). Kulture stanica inkubirane su na 37 °C u sterilnoj, vlažnoj sredini s dodatkom 5% CO₂. Ekspanzijski medij u kulturama mijenjao se dva puta na tjedan.

3.2. Izolacija MMS iz koštane srži

Kontrolnu skupinu stanica činile su MMS izolirane iz koštane srži (KS-MMS). Te su stanice izolirane prema opisanoj metodi direktne adherencije stanica koštane srži iz glave femura⁸², rezidualnog kirurškog materijala nakon totalne artroplastike kuka. Uz prethodno odobrenje Etičkog povjerenstva, izolirane su KS-MMS podrijetlom od 20 bolesnika u dobi od 40-84 godine (prosjek godina 64). Ukratko, glave femura prenesene su u sterilnim posudama u laboratorij, gdje se unutar 6 sati od zahvata u sterilnim uvjetima aspirira koštana srž. Aspirati koštane srži se prebace u 15 mL polipropilenske kušalice te centrifugiraju kroz 6 minuta na 1100 okretaja u minuti. Koštana srž time se razdvoji na gornji serozni sloj i donji sloj u kojem se nalaze gusto nataložene crvene krvne stanice. Sadržaj gornjeg seroznog sloja se aspirira te kultivira tijekom 24 sata u posudama T-150 za kulturu stanica, pri čemu se u tkivnu posudu od 150 cm² unese oko 5 mL seroznog aspirata. Ekspanzijski medij jednak je onom koji se upotrebljava za kultiviranje T-MMS, dakle, sastoji se od DMEM u kojem se nalazi 10% FBS, antibiotici i amfotericin B. Nakon 24 sata neadherentne stanice se odstrane iz kulture serijskim ispiranjem pomoću FPO i promjenom ekspanzijskog medija. Nakon toga se ekspanzijski medij mijenja dva puta na tjedan. Adherentne stanice uskoro se prikazuju u monosloju kao nakupine fibroblastičnih stanica. Kao i T-MMS, kulture KS-MMS inkubirane su u sterilnoj, vlažnoj sredini s dodatkom 5% CO₂ i na temperaturi od 37 °C.

3.3. Ekspanzija stanica

Kad bi pod faznim kontrastom MMS u kulturi dosegle konfluenciju od oko 80%, one se isperu dva puta s FPO, odvoje od posuda za staničnu kulturu 5-minutnom

primjenom 0,25% tripsin-EDTA otopine (Gibco BRL) ugrijane na temperaturu od 37 °C (što se naziva tripsinizacijom), isperu dva puta centrifugiranjem u ekspanzijskom mediju (1200 okretaja/min kroz 5 minuta), te reinkubiraju u omjeru 1:3 u troslojne posude za kulturu stanica (engl. *Triple Flask*, Nunc, Rochester, NY) u istim uvjetima stanične kulture. Inicijalna kultura stanica obilježena je kao P0, a svaka slijedeća kultura nakon tripsinizacije naziva se subkultura (subpopulacija, pasaža) i obilježena je brojem koji označava broj izloženosti tripsinu (npr. P1, P2, P3 itd.). U studiji su se za analizu površinskih epitopa i diferencijacijskog potencijala rabile MMS iz subkultura 2-5.

3.4. Karakterizacija kinetike rasta MMS i ponašanja u kulturi

Izgled MMS u kulturi stanica analizirao se faznom kontrastnom mikroskopijom, dinamika rasta stanica testom stanične proliferacije (MTS-test), a potencijal stvaranja kolonija i broj MMS u mononuklearnom aspiratu CFU-F testom (prema engl. *colony-forming units cell assay*) i metodom krajnjeg razrjeđenja (engl. *limiting dilution method*).

Za provedbu testa stanične proliferacije MMS se kultiviraju u ekspanzijskom mediju u staničnim posudama s 12 jažica (engl. *12-well plates*, Nunc, Rochester, NY, SAD) pri gustoći od 1×10^4 stanica/cm². Na dan analize stanične proliferacije u svaku jažicu tkivne posude doda se *CellTiter 96® Aqueous One Solution* reagens (Promega, Madison, WI, SAD) prema originalnim uputama proizvođača. Nakon 4 sata inkubacije na 37 °C stanična proliferacija MMS odredi se mjerenjem apsorbancije otopine na valnoj

duljini 490 nm uz uporabu 550 BioRad čitača (engl. *Bio-Rad Plate Reader*, Bio-Rad, Hertfordshire, Velika Britanija).

CFU-F test temelji se na znakovitom svojstvu MMS da stvaraju kolonije u staničnoj kulturi *in vitro*. U istraživanju MMS ovaj test služi za određivanje broja MMS u ukupnom broju mononuklearnih stanica izoliranih iz donorskog tkiva. Prosječan broj stanica potreban da stvori jednu koloniju s više od 50 MMS određen je zasijavanjem 1000 mononuklearnih stanica (stanica mononuklearnog aspirata nakon odvajanja pomoću Ficoll-Paque otopine) po cm^2 u tkivnim posudama površine 75 cm^2 (engl. *T-75 tissue culture flask*, Corning). Nakon 14-dnevne kultivacije, fiksacije metanolom i bojenjem po Wright-Giemsi (Sigma-Aldrich) analizira se broj kolonija i MMS⁸³.

Metoda krajnjeg razrjeđenja (engl. "*limiting dilution*") sastoji se u kultiviranju aspirata mononuklearnih stanica u tkivnim posudama sa 6 jažica (engl. *6-well plates*, Nunc) u serijskim kontroliranim razrjeđenjima. Stanice se kultiviraju u triplikatima pri gustoći od 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 i 1×10^4 stanica/ cm^2 . Nakon 2 tjedna kultivacije u ekspanzijskom mediju kulture su fiksirane u 10% formalinu i obojene po Wright-Giemsi. Kolonije stanica nalik na fibroblaste identificiraju se faznim kontrastnim mikroskopom pri povećanju x25.

3.5. Karakterizacija površinskih epitopa MMS

3.5.1 Imunofluorescencija uz analizu konfokalnim mikroskopom

Za analizu pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa (KLSM) kultivirane MMS se u troslojnim posudama isperu dva puta s FPO, odvoje od posuda 5-minutnom primjenom otopine 0,25% tripsin-EDTA, te alikvotiraju u koncentraciji od 5×10^3 MMS/cm² na predmetna stakalca za tkivnu kulturu s komoricama (engl. *tissue culture grade glass chamber slides*, Nalge Nunc, Naperville, IL, SAD). Nakon 24 sata kultiviranja u bazalnom mediju (DMEM s dodatkom 10% FBS, bez antibiotika) MMS se dvaput isperu otopinom FPO, fiksiraju pomoću 4% paraformaldehida u FPO (FD NeuroTechnologies Inc., Baltimore, MD, SAD) kroz 15 min, a potom permeabiliziraju u otopini FPO koja sadržava 300 mM sukroze, 3 mM MgCl₂ i 0,5% Tritona X-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) kroz 5 minuta na 4 °C. Nakon što se nespecifična mjesta na membrani MMS blokiraju pomoću 1% goveđeg serumskog albumina (Sigma-Aldrich) kroz 1 sat, površinski stanični biljezi se dokazuju pomoću specifičnih mišjih monoklonskih antitijela u koncentraciji od 0,5 ng/μL (sva antitijela su proizvedena u BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). MMS su testirane na slijedeće biljege: CD14, CD34, CD45, CD29, CD44, CD90 i CD105. Sekundarno antitijelo bilo je kozji anti-mišji imunoglobulin konjugiran s fluorescentnom bojom *Alexa Fluor 488* (Molecular Probes, Eugene, OR, SAD). Bojenje jezgre stanica provodi se pomoću 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI; Molecular Probes) kroz 5 min (12 μg DAPI u 30 mL FPO). Obojene kulture su fiksirane pomoću Fluoromounta-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, SAD) te analizirane pomoću KLSM (Zeiss LSM 510, Njemačka). Ukratko, načelo rada KLSM je slijedeće: svjetlosni izvor mikroskopa je laserska zraka fokusirana prije ulaza u mikroskopsko polje pomoću posebne aperture, a leća objektiva

dodatno fokusira lasersku zraku u mali fokalni volumen svjetlosti unutar fluorescentnog preparata. Emitirana fluorescencija preparata i reflektirana laserska zraka odbijaju se natrag u leću objektiva. Poseban uređaj unutar mikroskopa (engl. *beam splitter*) razdvaja laserske zrake od emitirane fluorescencije preparata, dozvoljavajući samo daljnju analizu signala iz preparata. Fluorescirajuće svjetlo dodatno se filtrira i računalno obrađuje. Uz vrlo atraktivan i iznimno kvalitetan slikovni prikaz, prednosti KLSM u odnosu na konvencionalnu optičku mikroskopiju su kontrola dubine vidnoga polja, mogućnost isključenja slikovne informacije koja nije od interesa, te mogućnost prikupljanja i pregleda serijskih optičkih rezova kroz debele preparate (slično metodi kompjutorizirane tomografije u radiologiji).

3.5.2. Protočna citometrija

Za analizu protočnom citometrijom se MMS ($>1 \times 10^5$ stanica) nekoliko puta isperu u otopini FPO te na temperaturi od 4 °C resuspendiraju u istoj otopini s dodatkom 2% FBS (FF) koji sadrži saturirajuće koncentracije (razrjeđenje 1:100) mišjih anti-humanih monoklonskih antitijela konjugiranih s fluorescein-izotiocijanatom (FITC), fikoeritrinom (PE) ili alofikocijaninom (APC). U studiji su upotrebljena antitijela na HLA-A,B,C-PE (MHC I), HLA-DR,DP,DQ-FITC (MHC II), CD45-PE, CD14-PE, CD31-PE, CD34-PE, CD73-PE, CD105-PE i CD90-APC (sva antitijela od BD Biosciences). Nakon sat vremena stanične suspenzije se dva puta isperu otopinom FPO te resuspendiraju u FF za analizu protočnim citometrom *FACSCalibur* (BD Biosciences) uz pomoć računalnog programa *CellQuest Pro v 4.0.2* (BD Biosciences). Pozitivno bojenje

definirano je kao fluorescentna emisija veća od emisije više od 99% stanica negativne kontrole (ista stanična razrjeđenja MMS bez uporabe antitijela).

3.6. *In vitro* diferencijacija MMS

Diferencijacija MMS u koštano, hrskavično i masno tkivo provedena je prema opisanim protokolima⁸². MMS kultivirane u troslojnim posudama isperu se dva puta u otopini FPO te nakon primjene otopine 0,25% tripsin-EDTA reinkubiraju u polistirenskim posudama u monosloju za indukciju osteogeneze i adipogeneze, odnosno polipropilenskim posudama u trodimenzionalnoj konformaciji za indukciju hondrogeneze.

Za osteogenu indukciju upotrebljen je osteogeni medij koji se sastoji od ekspanzijskog medija s dodatkom 10mM β -glicerol-fosfata (Sigma-Aldrich), 10 nM deksametazona (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL askorbične kiseline (Sigma-Aldrich), te 10 nM 1,25 dihidroksivitamina D3 (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, PA, SAD). Nakon tripsinizacije se T-MMS i KS-MMS reinkubiraju u polistirenskim tkivnim posudama sa 6 jažica (engl. *6-well plates*, Nunc, Rochester, NY, SAD) s inicijalnom gustoćom stanica od 2×10^4 MMS/cm². Kulture se uzgajaju na 37 °C u vlažnoj sredini obogaćenoj s 5% CO₂, a promjena osteogenog medija provodi se tri puta na tjedan. Nakon tri tjedna osteogene aktivacije učini se histološka, histokemijska i RT-PCR analiza na koštano tkivo. Istodobno su za kontrolu diferencijacije upotrebljene kulture istih T-MMS i KS-MMS (s inicijalnom gustoćom od 2×10^4 MMS/cm² kulture) koje su tri tjedna kultivirane u ekspanzijskom mediju bez diferencijacijskih čimbenika.

Hondrogena diferencijacija nastaje kada se MMS kultiviraju u specifičnim uvjetima, od kojih su nužni: (1) inkubacija i rast stanica u trodimenzionalnoj konformaciji; (2) medij bez seruma; i (3) faktori rasta iz porodice TGF. U ovom se ispitivanju rabio tzv. “*pellet*” model trodimenzionalne hondrogeneze u kulturi stanica. Ukratko, nakon tripsinizacije i ispiranja s FPO, MMS se raspodijele u polipropilenske (neadherirajuće) pločice za staničnu kulturu s 96 jažica (engl. *96-microwell polypropylene plates*, Nunc, Roskilde, Danska), po 3×10^5 MMS u svaku jažicu. Pločice se zatim centrifugiraju tijekom 6 minuta na 1100 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja na dnu jažice stanice stvaraju kompaktan trodimenzionalni talog, tzv. *pellet*. Kulture se također inkubiraju na 37 °C u vlažnoj sredini obogaćenoj s 5% CO₂. Hondrogeni medij se mijenja tri puta na tjedan, a sastoji se od DMEM s visokim postotkom glukoze uz dodatak 100 nM deksametazona, 50 µg/mL askorbične kiseline, 100 µg/mL natrij-piruvata (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL L-prolina (Sigma-Aldrich), 50 mg/mL ITS-Premixa (BD Biosciences) i 10 ng/mL rekombinantnog humanog TGF-β3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD). Nakon svake promjene medija pločice se blago protresu kako bi se uvjerilo da su *pelleti* kuglastog oblika i da slobodno lebde u mediju. Istodobno su za kontrolu hondrogeneze upotrebljeni *pelleti* što ih stvorili T-MMS i KS-MMS, ali kultivirani u ekspanzijskom mediju bez dodatka hondrogenih čimbenika. *Pelleti* su kultivirani u medijima tijekom tri tjedna, a potom su podvrgnuti analizi. Da bi se dokazala indukcija MMS u hrskavično tkivo, matriksi hrskavčnih *pelleta* obojeni su bojom Alcian Blue te je učinjena analiza hrskavičnih biljega pomoću RT-PCR.

Za indukciju adipogeneze MMS su uzgajane u polistirenskim tkivnim posudama sa 6 jažica u monosloju na 37 °C. Inicijalna gustoća u kojoj su stanice zasijane iznosila je 2×10^4 MMS/cm². Adipogeni medij sastojao se od ekspanzijskog medija s dodatkom 0,5 mM izobutilmetilksantina (IBMX, Sigma-Aldrich), 1 µg/mL inzulina (Sigma-Aldrich), 1 µM deksametazona (Sigma-Aldrich), a medij se mijenjao tri puta na tjedan. Za kontrolu diferencijacije upotrebljene su kulture T-MMS i KS-MMS (s inicijalnom gustoćom sijanja MMS od 2×10^4 /cm²) koje su tri tjedna kultivirane u ekspanzijskom mediju bez adipogenih čimbenika.

3.7. Analiza diferencijacijskih biljega pomoću RT-PCR

Ukupna stanična RNA iz osteocitnih i adipocitnih monokultura izolirana je nakon 21 dana diferencijacije upotrebom Trizol reagensa (Gibco BRL) prema originalnim uputama proizvođača. Kako bi se izolirala što veća količina stanične RNA, *pelleti* inkubirani u hondrogenom mediju prethodno su homogenizirani u Trizol reagensu upotrebom plastične drobilice (engl. *pestle*, Kontes, Vineland, NJ, SAD). *Pelleti* su homogenizirani u 1,5 mL-kušalicama za mikrocentrifugiranje uz dodatak 1 mL Trizola, dok se za osteocite i adipocite Trizol dodavao izravno u kulturu. Nakon ekstrakcije s kloroformom i precipitacije s izopropanolom talog RNA je pohranjen na -20 °C u 80% etanolu. Prije reverzne transkripcije aspirira se etanol, a talog RNA se prvo osuši, a potom otopi u vodi bez nukleaza. Na kraju se u otopini RNA spektrofotometrijski odredi koncentracija RNA na bazi A₂₆₀. RNA uzorci (2 µg ukupne stanične RNA) su reverzno prepisani uporabom *random hexamera* i sustava *SuperScript First Strand Synthesis* (Gibco BRL). cDNA proizvodi su amplificirani pomoću *Taq* polimeraze (Perkin Elmer,

Norwalk, CT, USA) u uređaju *Thermal Controller* s mogućnošću preprogramiranja (MJ Research Inc., Watertown, MA, SAD). Gensko-specifični *primeri* koji su se rabili u ovom istraživanju prikazani su u **tablici 1**. Oni uključuju adipogene gene: lipoproteinsku lipazu (LPL) i peroksisomski proliferator-aktivirajući receptor- γ (PPAR γ); osteogene gene: alkalnu fosfatazu (ALP), kolagen tipa I α 2 (COL1A2) i osteokalcin (OC); hondrogene gene: kolagen tipa II α 1 (COL2A1), IX (COL9) i agrekan (AGN). Gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) rabio se za kontrolu stanične RNA (tzv. *housekeeping* gen). Za sve gene polimerazna reakcija učinjena je kroz 32 ciklusa, od kojih se svaki sastojao od jednodominutne denaturacije na 95 °C, jednodominutnog taljenja na 51 °C (GAPDH, LPL, PPAR γ), 57 °C (COL9, AGN), 58 °C (COL1, OC, ALP) ili 59 °C (COL2); jednodominutne polimerizacije na 72 °C; i konačne 10-minutne ekstenzije na 72 °C. Proizvodi PCR analizirani su elektroforezom u *Metaphor* agaroznom gelu (FMC Corp., Rockland, ME, SAD) s 2% etidijum bromida. PCR-gelovi slikovno su analizirani uz pomoć radne stanice *Kodak Image Station* i računalnog programa (440 CF Digital Image Station, Rochester, NY, SAD).

3.8. Kvantitativna (*real-time*) PCR analiza razine ekspresije specifičnih diferencijacijskih biljega

Ukupna stanična RNA iz osteocitnih, adipocitnih i hondrocičnih kultura izolirana je upotrebom Trizol reagensa, a potom je provedeno reverzno prepisivanje u cDNA uporabom *random hexamera* i sustava *SuperScript First Strand Synthesis* (Gibco BRL). *Real-time* polimerazna lančana reakcija provedena je miješanjem 10 ng cDNA sa *SYBR Green mixom* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Gensko-specifični *primeri* (*forward/reverse*)

Gen	Sekvence <i>primera</i> (5'–3')	Položaj (pb)	Predviđena veličina (pb)
Housekeeping gen			
GAPDH	<i>Sense</i> : GGGCTGCTTTTAACTCTGGT <i>Antisense</i> : GCAGGTTTTCTAGACGG	134–835	702
Osteogeno-specifični geni			
ALP	<i>Sense</i> : TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA <i>Antisense</i> : ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	122–575	454
COL1A2	<i>Sense</i> : GGACACAATGGATTGCAAGG <i>Antisense</i> : TAACCACTGCTCCACTCTGG	3209–3669	461
OC	<i>Sense</i> : ATGAGAGCCCTCACACTCCTC <i>Antisense</i> : GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	19–312	294
Adipogeno-specifični geni			
LPL	<i>Sense</i> : GAGATTTCTCTGTATGGCACC <i>Antisense</i> : CTGCAAATGAGACACTTTCTC	1261–1536	276
PPAR γ	<i>Sense</i> : GCTGTTATGGGTGAAACTCTG <i>Antisense</i> : ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC	153–503	351
Hondrogeno-specifični geni			
AGN	<i>Sense</i> : TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC <i>Antisense</i> : GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA	6591–6910	350
COL2A1	<i>Sense</i> : CAGGTCAAGATGGTC <i>Antisense</i> : TTCAGCACCTGTCTCACCA	1341–1717	377
COL9	<i>Sense</i> : GTGTTGCTGGTGAAAAGGGT <i>Antisense</i> : GGGATCCCACTGGTCCTAAT	6561–6910	159

GAPDH—gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza, ALP—alkalna fosfataza, COL1A2—kolagen tipa I α 2, OC—osteokalcin, LPL—lipoproteinska lipaza, PPAR γ —peroksisomski proliferator-aktivirajući receptor- γ , AGN—agrekan, COL2A1—kolagen tipa II α 1, COL9—kolagen tipa IX, **pb**—parova baza.

Tablica 1. Sekvence *primera* za analizu diferencijacijskih gena pomoću RT-PCR

dizajnirani su prema *GenBank cDNA* sekvencama: (a) adipogeni geni LPL i PPAR γ , (b) osteogeni geni ALP i OC, te (c) hondrogeni geni COL2A1 i AGN. Specifične transkripcijske vrijednosti su normalizirane prema vrijednosti *housekeeping* gena GAPDH. Razina ekspresije predstavljena je kao višekratnik u odnosu na ekspresiju GAPDH, prema formuli $2^{-(\Delta Ct)}$, gdje je $\Delta Ct = Ct$ ispitivanog gena – Ct GAPDH-a (Ct dolazi od engl. *cycle threshold*, a označava broj polimerizacijskih ciklusa potrebnih da se zamijeti fluorescentni signal).

3.9. Histološka i histokemijska analiza diferencijacije

U ovom su se istraživanju rabila slijedeća specifična bojenja stanica i tkiva: Oil red O za adipozno tkivo, Alcian Blue za dokazivanje hrskavičnog matriksa, Alizarin red S za bojenje koštane mineralizacije, te histokemijska analiza aktivnosti alkalne fosfataze u koštanom tkivu.

3.9.1. Oil Red O bojenje

Monokulture MMS koje su tri tjedna kultivirane u adipogenom mediju isperu se dva puta otopinom FPO te fiksiraju u 4% paraformaldehidu (FD NeuroTechnologies Inc.) koji se nakon 15 minuta ispere destiliranom H₂O. Potom se pri sobnoj temperaturi doda Oil red O boja (Sigma-Aldrich). Nakon 5 minuta kulture se temeljito isperu običnom vodom, te se naposljetku oboje otopinom hematoksilina modificiranom po Harrisu (Sigma-Aldrich).

3.9.2. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze

MMS diferencirane kroz 3 tjedna u osteogenom mediju fiksiraju se 4%-tnom otopinom paraformaldehida. Set za mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze (Sigma-Aldrich, kataloški broj 86-C) upotrebljen je prema originalnim uputama proizvođača. Stanice se oboje naftol AS-BI supstratom te se tijekom 30 minuta drže na temperaturi od 37 °C u potpunom mraku. Reakcija se zaustavlja obilnim ispiranjem kultura destiliranom vodom.

3.9.3. Alizarin Red S bojenje

T-MMS i KS-MMS su diferencirane 3 tjedna u osteogenom mediju, nakon čega se isperu i fiksiraju 60%-tnim izopropilnim alkoholom (Sigma-Aldrich). Nakon 1-minutne fiksacije alkohol se dva puta ispere destiliranom vodom. Kulture se potom tijekom 3 minute boje s 2%-tnom otopinom Alizarin Red S pH vrijednosti 4,2 (Rowley Biochemical Institute, Danvers, MA, SAD), potom se isperu nekoliko puta destiliranom vodom i na kraju osuše na zraku.

3.9.4. Alcian Blue bojenje

Pelleti se izvade iz kultura, fiksiraju 30 minuta u 4% puferiranom paraformaldehidu na sobnoj temperaturi, isperu otopinom FPO, serijski dehidriraju alkoholnim razrjeđenjima, infiltriraju amil-acetatom i na kraju fiksiraju u parafinu. Parafinski se blokovi režu na debljinu od 10 µm za histološko bojenje pomoću Alcian blue.

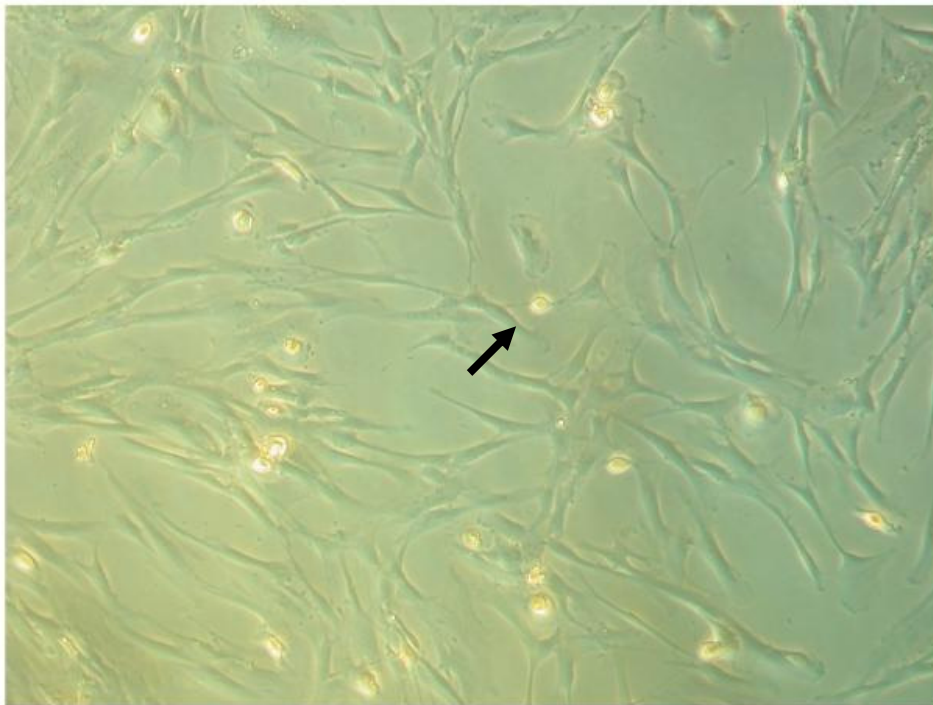
3.10. Statistička analiza prikupljenih podataka

U uspoređivanju rezultata rabili su se su neparametrijski testovi. Određena razina značajnosti bila je $p=0,05$.

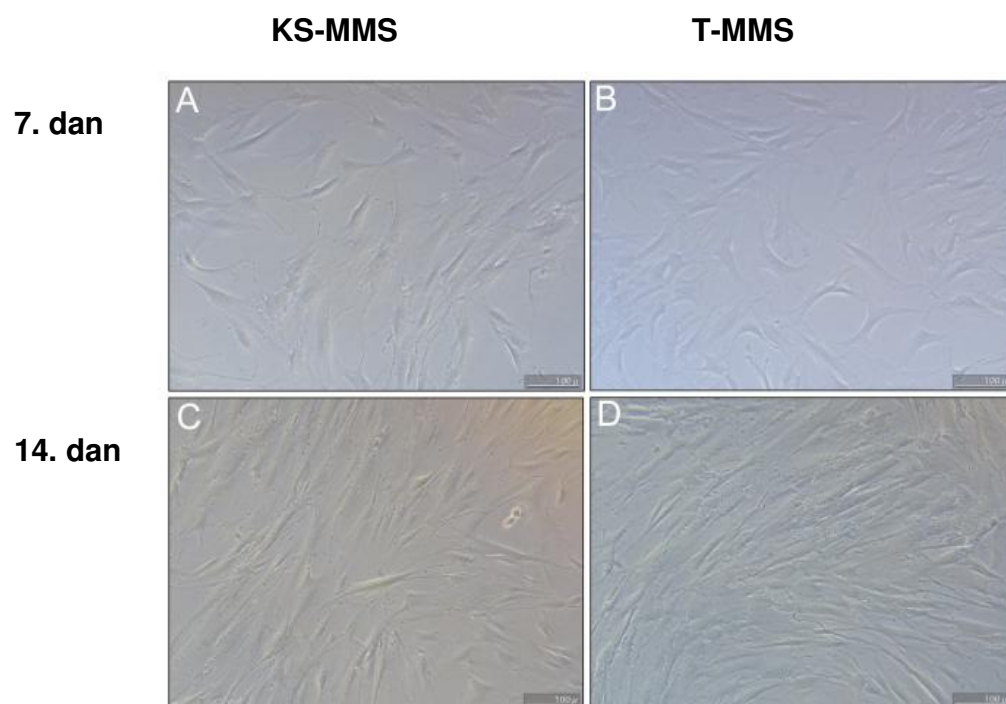
4. REZULTATI

4.1. Morfologija T-MMS

Ukupan broj mononuklearnih stanica izoliranih iz svake nepčane tonzile iznosio je $1-5 \times 10^9$. Većina tih stanica bila je neadherentna, tj. hematopoetskog podrijetla. Nakon serijskih ispiranja stanica u otopini FPO te kasnijim promjenama ekspanzijskog medija, samo je 0,1%-1% prvobitno izoliranih stanica ostalo prionuto za dno polistirenskih posuda za tkivnu kulturu. Kolonije stanica počele bi se stvarati između 5. i 10. dana od inicijalne izolacije, što bi se vidjelo pod mikroskopom s faznim kontrastom. Općenito, zamijetile su se tri osnovne morfologije stanica: (1) vretenaste stanice nalik fibroblastima; (2) vrlo male epiteloidne stanice poligonalne morfologije; i (3) okrugle stanice s velikom jezgrom (monocitna kontaminacija) (**slika 1.**). Male epiteloidne stanice brzo su nestajale iz kulture sa svakom promjenom medija još i prije prve tripsinizacije, što je ukazivalo na to da ne mogu preživjeti u ekspanzijskom mediju za MMS. Prilikom ekspanzije stanica u novu subpopulaciju (pasažu), 5-minutna tripsinizacija nije bila dovoljno duga za odvajanje okruglih (monocitnih) stanica od dna staničnih posuda. Ta je populacija ostala prionuta za stare posude i nakon druge pasaže nije se vidjela niti pod faznim kontrastom niti se mogla dokazati ekspresijom mijelomonocitnog biljega CD14. U kasnijim pasažama T-MMS su izgledale kao homogena populacija vretenastih, fibroblastičnih stanica od kojih većina sadrži nekoliko tankih produljenih izdanaka citoplazme. Broj citoplazmatskih izdanaka po stanici rijetko je bio veći od 10. Jezgre T-MMS su okrugle, centralno smještene s prominentnom jezgrom okruženom nježno razasutim kromatinom, što



Slika 1. Morfologija stanica u inicijalnoj kulturi (P0). Prikaz kulture stanica pod faznim kontrastnim mikroskopom (povećanje x20). Vidljiva su dva morfološka tipa adherentnih stanica: 1) fibroblastične, vretenaste stanice s manjim citoplazmatskim izdancima (T-MMS) i 2) okrugle stanice s velikim jezgrama (monocitna kontaminacija, označeno strelicom).



Slika 2. Morfologija KS-MMS i T-MMS druge subkulture (P2). Kulture stanica su analizirane pomoću faznog kontrastnog mikroskopa, prikaz kultura 7. i 14. dana. Vidljiva je jednaka morfologija fibroblastičnih stanica i intenzivnija proliferacija T-MMS nakon 14 dana u kulturi u odnosu na KS-MMS. KS-MMS: **A)** nakon 7 dana, **C)** nakon 14 dana; T-MMS: **B)** nakon 7 dana, **D)** nakon 14 dana.

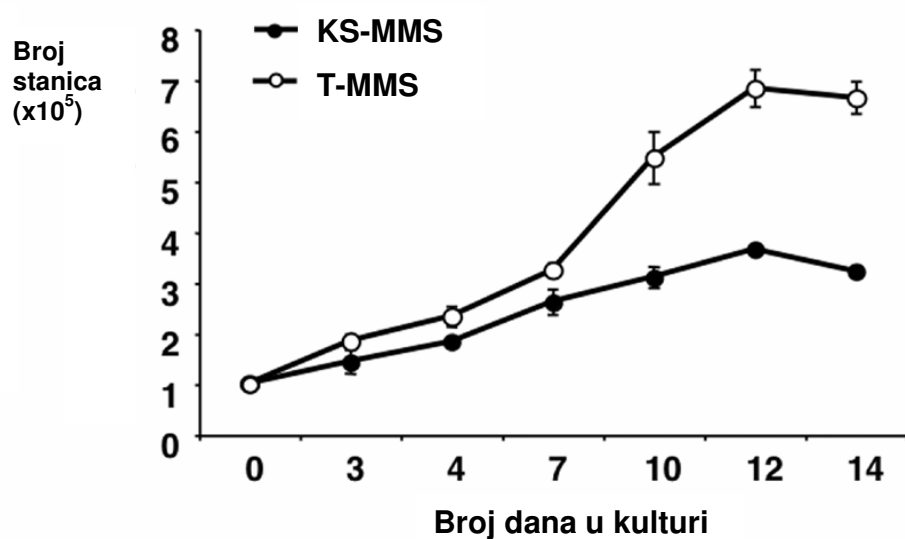
jezgrama T-MMS daje proziran izgled. Pod svjetlosnim mikroskopom T-MMS se nisu mogle morfološki razlikovati od KS-MMS sličnih pasaža (**slika 2.**). Najznačajnija razlika bila je u tome što su T-MMS bile nešto manje od KS-MMS (za oko 1/4 do 1/3 duljine stanica), pa je njihov broj pri 80%-tnoj konfluenciji u uzgojnim posudama bio obrnuto proporcionalno veći. Vrijeme potrebno za 80%-tnu konfluenciju iznosilo je 15-25 dana za inicijalnu kulturu stanica (P0 kulturu), te 4-7 dana za iduće subkulture (P1 i dalje). Prilikom ekspanzije bi se iz svake troslojne posude za kulturu stanica (*Triple Flask*) izoliralo $7-10 \times 10^6$ T-MMS, u usporedbi s $4-8 \times 10^6$ KS-MMS.

4.2. Proliferativni potencijal T-MMS

In vitro MTS-test pokazao je značajnu razliku u proliferaciji između T-MMS i KS-MMS. Podaci o proliferaciji u kulturi tijekom 14 dana prikazani su na **slici 3.** Inicijalno je u stanične kulture zasijan isti broj T-MMS i KS-MMS, no T-MMS su se značajno brže umnožavale tijekom čitavog trajanja pokusa. Utvrđeno je da je prosječno vrijeme udvostručenja T-MMS bilo $37 \pm 3,4$ h u usporedbi s $58 \pm 2,3$ h za KS-MMS (**tablica 2.**). Nadalje, kumulativni broj dioba MMS u kulturi do 14. dana iznosio je $2,7 \pm 0,13$ za T-MMS, a $1,69 \pm 0,06$ za KS-MMS.

4.3. Sposobnost stvaranja kolonija

Da bi se utvrdila sposobnost stvaranja kolonija, inicijalni aspirati mononuklearnih stanica (nakon odvajanja pomoću Ficoll-Paque otopine) zasijani su u tkivne posude površine 75 cm^2 u koncentraciji od 1000 mononuklearnih stanica/ cm^2 . Nakon 14 dana kultivacije, fiksacije formalinom i bojenja, prosječan broj stvorenih kolonija bio je



Slika 3. Dinamika proliferacije T-MMS i KS-MMS prema MTS testu. T-MMS i KS-MMS su kultivirane u staničnim posudama s 12 jažica pri istoj inicijalnoj gustoći od 1×10^4 stanica/cm². Vidljiva je razlika u proliferaciji između T-MMS i KS-MMS, pri čemu su se T-MMS umnožavale većom brzinom tijekom čitavog trajanja testa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=15).

	T-MMS	KS-MMS
Vrijeme udvostručenja populacije (u satima)*	37,46±3,41	58,36±2,29
Broj udvostručenja populacije u 14 dana*	2,72±0,13	1,69±0,06

* Sve vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD; n=19

Tablica 2. Kinetika rasta T-MMS i KS-MMS u kulturi. T-MMS predstavljaju populaciju stanica koja se može vrlo brzo umnožiti za potencijalnu kliničku primjenu

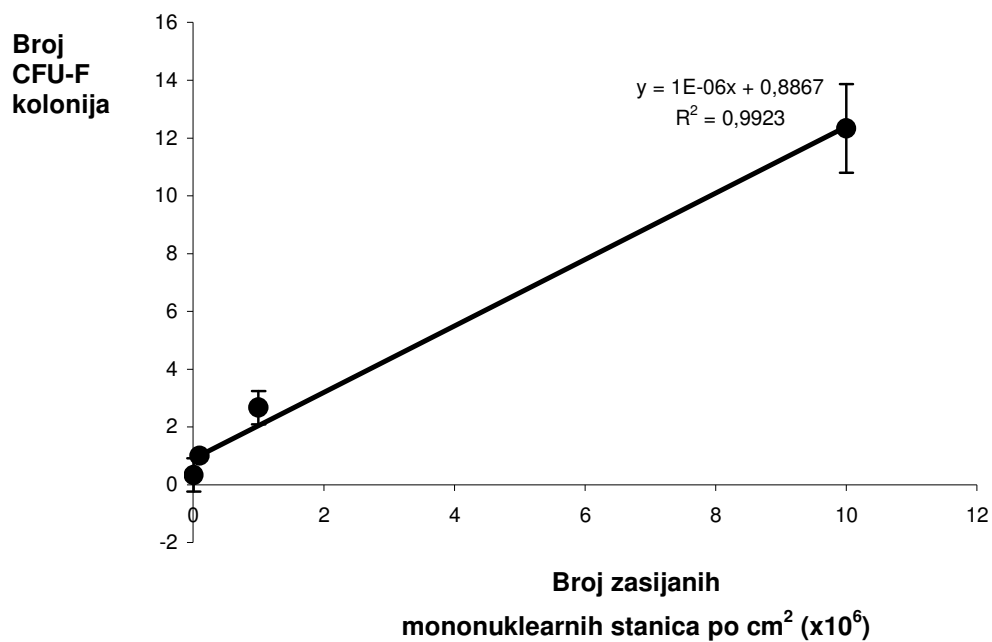
12,69±1,47 po T-75 tkivnoj posudi. Nadalje, uz pomoć tih podataka utvrđeno je da je frekvencija CFU-F bila 1 na 5.910 ($\pm 14,03$) zasijanih stanica, odnosno da se na približno 6.000 mononuklearnih stanica izoliranih pomoću Ficoll-Paque otopine iz digestije nepčanih tonzila nalazila jedna MMS.

Metodom krajnjeg razrjeđenja kultivirani su aspirati mononuklearnih stanica pri gustoći od 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 i 1×10^4 stanica/cm². Regresijska analiza pokazala je linearnu povezanost između broja kolonija i broja kultiviranih stanica (**slika 4.**).

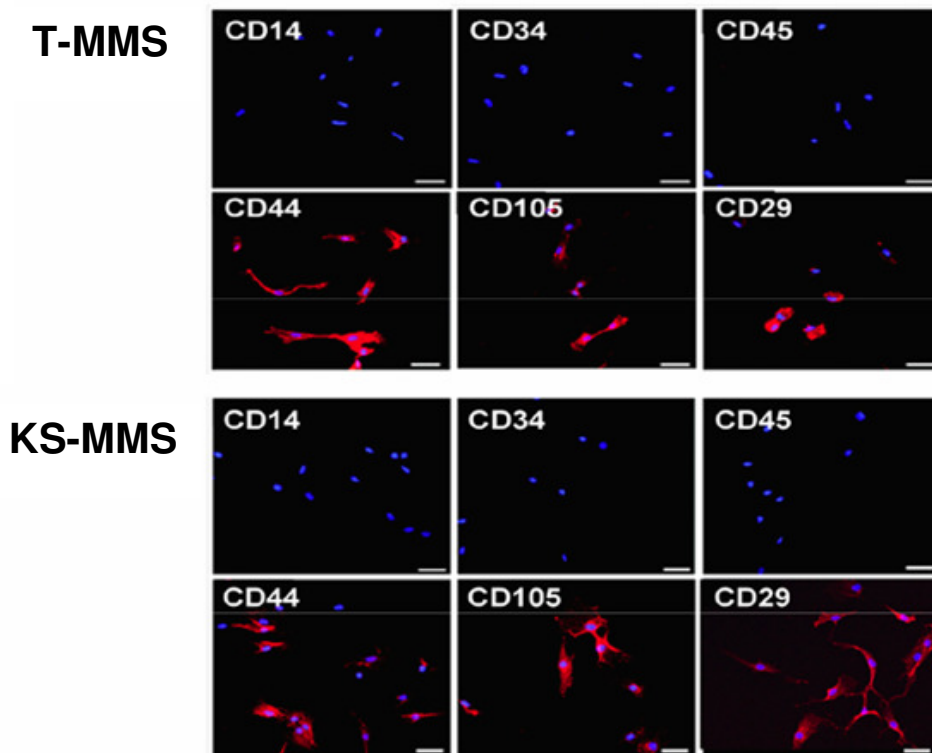
4.4. Imunofluorescencija i analiza protočnom citometrijom

Metodama imunofluorescencije i protočne citometrije na površini T-MMS i KS-MMS nađen je izražaj istih površinskih biljega, dok hematopoetski površinski biljezi nisu bili izraženi niti na T-MMS niti na KS-MMS. Metodom imunofluorescencije uz analizu KLSM na površini T-MMS i KS-MMS nađeni su CD29 ($\beta 1$ -integrin), CD44 (hijaluronski receptor), CD 90 (Thy-1, antigen timusnih stanica) i CD105 (endoglin), dok izražaj hematopoetskih površinskih biljega CD14 (monocitnog diferencijacijskog antigena), CD34 (biljega hematopoetskih matičnih stanica) i CD45 (zajedničkog leukocitnog antigena) nije zabilježen (**slika 5.**).

Analiza površinskih biljega T-MMS protočnom citometrijom isključila je CD14, CD34 i CD45 te time potvrdila da te stanice nisu hematopoetskog podrijetla. Nadalje, neizražaj biljega CD31 isključio je endotelijsko podrijetlo stanica. Ipak, najznačajnije zapažanje bilo je da su na T-MMS bili pozitivni isti stanični površinski epitopi kao i

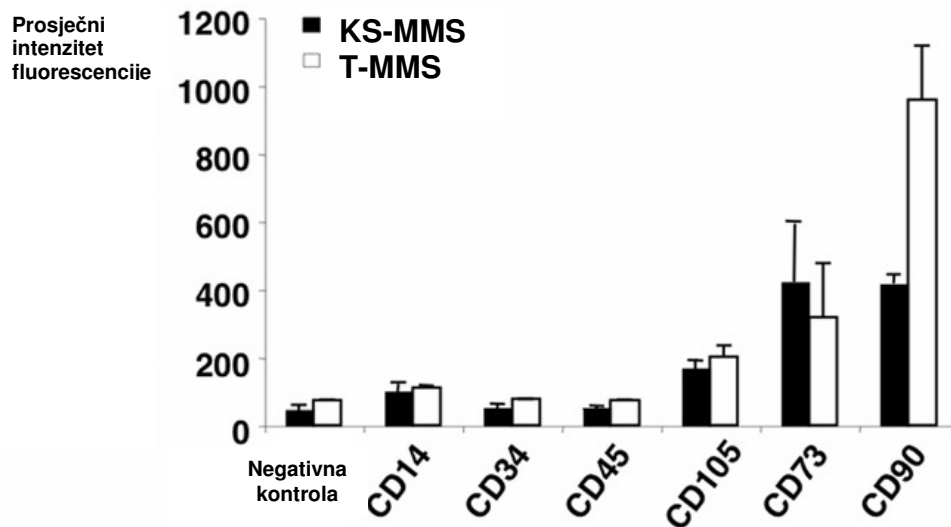


Slika 4. Sposobnost stvaranja kolonija utvrđena CFU-F testom i metodom krajnjeg razrjeđenja. Inicijalni aspirati mononuklearnih stanica (nakon odvajanja pomoću Ficoll-Paque) zasijani su u stanične posude u koncentracijama od 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 i 1×10^4 stanica/cm². Regresijska analiza pokazala je linearnu povezanost između broja kolonija i inicijalne gustoće kultiviranih stanica. Utvrđeno je da je CFU-F frekvencija 1 na 5.910 ($\pm 14,03$) zasijanih stanica, odnosno da se među ~6.000 mononuklearnih stanica izoliranih pomoću Ficoll-Paque iz digestije nepčanih tonzila nalazila jedna MMS.

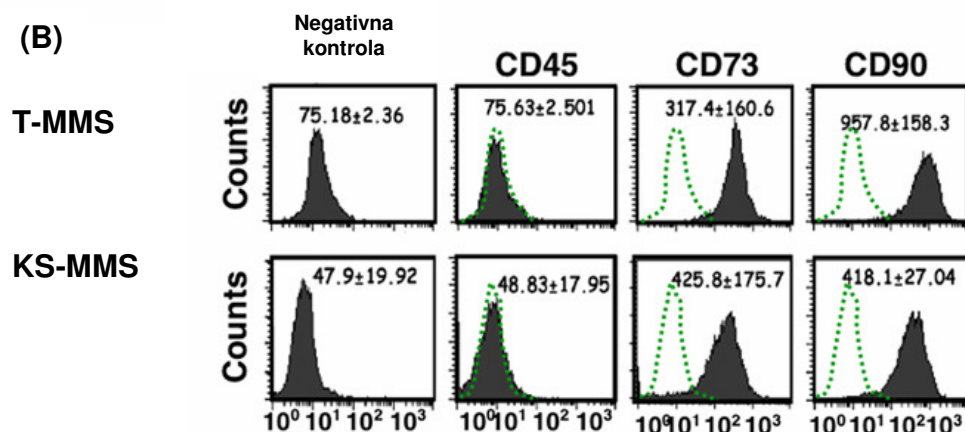


Slika 5. Imunofluorescentna analiza biljega na površini T-MMS i KS-MMS. Fluorescencija epitopa i jezgara promatrana je i slikovno zabilježena konfokalnim laserskim skenirajućim mikroskopom. Na površinske epitope vezana su fluorescirajuća sekundarna antitijela (obojena crveno). Jezgre stanica obojene su 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrokloridom (plavo). Obje populacije stanica, T-MMS i KS-MMS, bile su negativne na CD14, CD34 i CD45, te pozitivne na CD29, CD44 i CD105. Mjerilo pri dnu svake slike označava 20 μm .

(A)



(B)



Slika 6. Analiza T-MMS i KS-MMS protočnom citometrijom. (A) CD14, CD34, CD45, CD105, CD73 i CD90 – površinski biljezi koje je Međunarodno društvo za staničnu terapiju predložilo kao standard u identifikaciji MMS – utvrđeni su pomoću fluorescentno konjugiranih antitijela. Razina ekspresije svakog epitopa označena je kao prosječna fluorescentna aktivnost \pm standardna devijacija. (B) Reprezentativni histogrami protočne citometrije za površinske biljege CD45, CD73 i CD90. Kontrola (isprekidana crta) predstavlja spontanu autofluorescenciju MMS bez uporabe fluorescentirajućih antitijela.

na kontrolnim KS-MMS. Specifično, na površini obiju staničnih populacija bili su izraženi CD105, CD73 i CD90 (**slika 6.**). Intenziteti fluorescencije, odnosno razine izraženosti pozitivnih biljega nisu se statistički razlikovali između T-MMS i kontrolnih KS-MMS, osim za biljeg CD90 koji je bio izraženiji u T-MMS ($p=0,022$). Isto kao i KS-MMS, T-MMS su bile pozitivne na MHC molekule I. razreda i negativne na MHC molekule II. razreda.

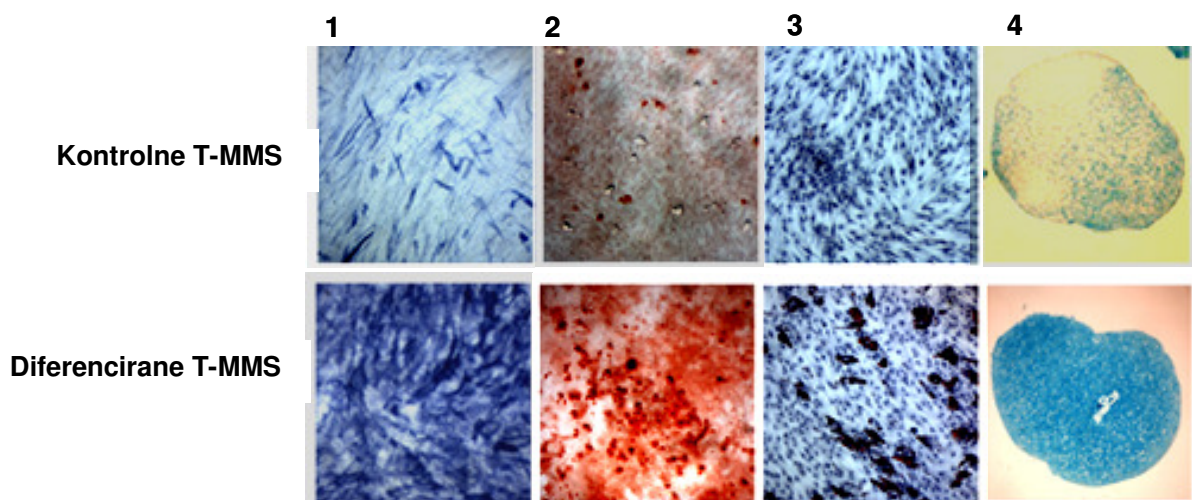
4.5. Adipogeni potencijal

Da bi se utvrdio adipogeni potencijal T-MMS pasaže 2 do 5 kultivirane su u polistirenskim posudama u monosloju uz dodatke adipogenih suplemenata: IBMX, inzulina i deksametazona. Kao kontrolne skupine stanica upotrebljene su kulture T-MMS i KS-MMS uzgajane kroz tri tjedna u ekspanzijskom mediju te KS-MMS kultivirane u adipogenom mediju. Već nakon tjedan dana izloženosti čimbenicima diferencijacije faznom kontrastnom mikroskopijom su zamijećene morfološke promjene T-MMS u smislu ravnomjernije raspoređenosti stanica u kulturi i pojačane globularnosti te stvaranja citoplazmatskih lipidnih nakupina koje su bile osobito dobro vidljive nakon histološke preparacije i bojenja pomoću Oil red O (**slika 7., podslika 3.**). Ekspresija LPL i PPAR γ , gena znakovitih za adipogenezu, nađena je pomoću RT-PCR 7., 14. i 21. dana nakon indukcije. Pri slikovnoj analizi agaroznih gelova zabilježena je jaća ekspresija signala adipogenih gena T-MMS u usporedbi s KS-MMS (**slika 8.**). Osobito zanimljivo bilo je zapažanje da je ekspresija adipogenih biljega bila intenzivnija u T-MMS iz kasnijih pasaža (P4, P5) u usporedbi sa stanicama ranijih

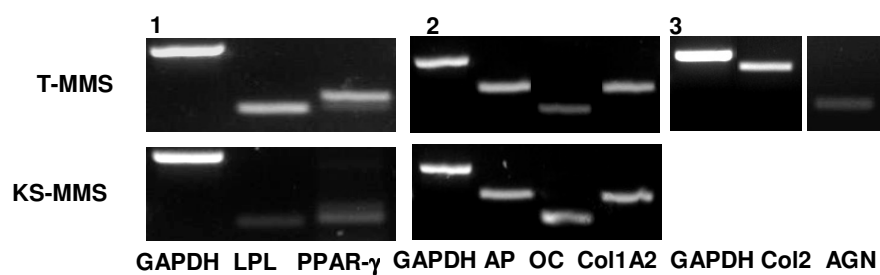
pasaža (P2, P3), što nije bio slučaj za KS-MMS gdje je intenzitet signala na agaroznom gelu bio izraženiji u ranijim pasażama stanica.

4.6. Osteogeni potencijal

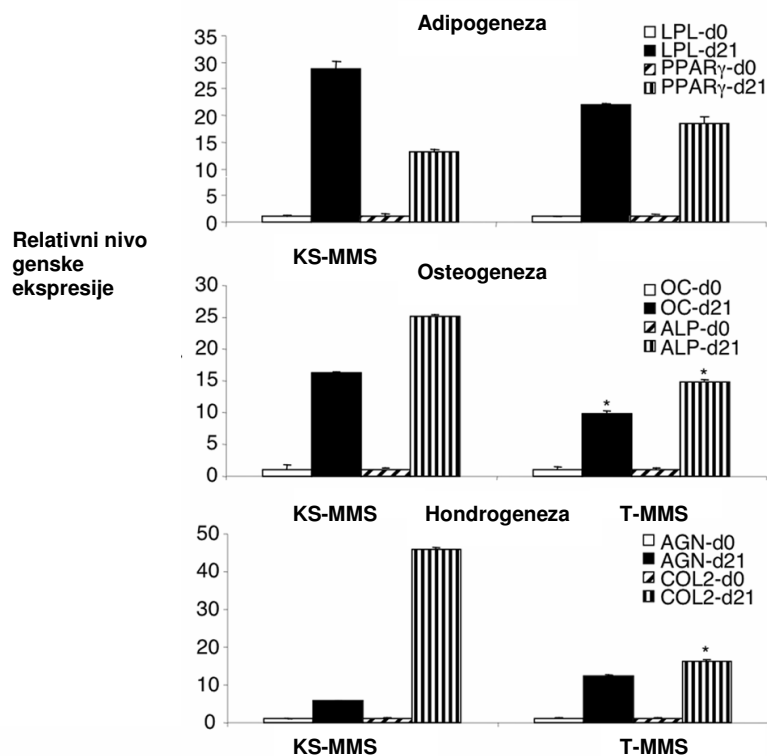
Kako bi se utvrdio osteogeni potencijal T-MMS, stanične kulture 2. do 5. pasaže T-MMS kultivirane su u osteogenom mediju tijekom 3 tjedna s izmjenom medija tri puta na tjeden. Za osteogenu indukciju upotrebljen je ekspanzijski medij s dodatkom β -glicerol-fosfata, deksametazona, askorbične kiseline i 1,25 dihidroksivitamina D3. Kontrolne stanice bile su T-MMS i KS-MMS uzgajane u ekspanzijskom mediju te KS-MMS inducirane u osteogenom mediju. Nakon poticanja diferencijacije u osteogenim uvjetima morfologija T-MMS i KS-MMS promijenila se od vretenaste u proširenu i poligonalnu. Analizom pomoću RT-PCR genska ekspresija COL1A2 i ALP bila je jednaka kod osteogeno induciranih T-MMS i KS-MMS, dok je ekspresija OC u T-MMS bila slabija nego u KS-MMS (**slika 8.**). Kvantitativna *real-time* PCR analiza objektivno je zabilježila nižu razinu ekspresije OC i ALP mRNA kod T-MMS u usporedbi s KS-MMS (**slika 9.**). Osteogena diferencijacija T-MMS također je potvrđena pozitivnim bojenjem pomoću Alizarin red S, tj. histološkom bojom koja se veže za kalcijske depozite osteogeno promijenjenih stanica i histokemijskim mjerenjem aktivnosti enzima alkalne fosfataze, koja je izražena u osteoblastičnim populacijama (**slika 7., podslike 1. i 2.**).



Slika 7. Histološki prikaz osteogene, adipogene i hondrogene diferencijacije tonzilarnih MMS. U prvom su redu slika prikazane kontrolne (nediferencirane) T-MMS, u drugom T-MMS nakon trodnevne diferencijacije u specifičnim medijima. Kod osteogeneze vidljiva je (1) pojačana aktivnost enzima alkalne fosfataze te (2) mineralizacija matriksa obojena crveno u histološkom bojenju Alizarin red S. Kod adipogeneze (3) bojenjem pomoću Oil red O vidljivo je stvaranje lipidnih vakuola. Kod hondrogeneze (4) Alcian blue bojenjem prikazuje se akumulacija matriksa bogatog sulfatiranim glikozaminoglikanima.



Slika 8. RT-PCR analiza genske ekspresije adipogene, osteogene i hondrogene diferencijacije T-MMS u usporedbi s KS-MMS. PCR agarozni gelovi slikovno su analizirani uz pomoć radne stanice *Kodak Image Station*. Prikazana je ekspresija (1) adipogenih gena: lipoproteinske lipaze (LPL) i peroksisomskog proliferator-aktivirajućeg receptora- γ (PPAR γ); (2) osteogenih gena: alkalne fosfataze (ALP), kolagena tipa I α 2 (COL1A2) i osteokalcina (OC); te (3) hondrogenih gena: kolagena tipa II α 1 (COL2A1) i agrekana (AGN) tri tjedna nakon diferencijacijske indukcije. GAPDH: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, gen za kontrolu stanične RNA.



Slika 9. Kvantitativna *real-time* PCR analiza genske ekspresije adipogene, osteogene i hondrogene diferencijacije T-MMS u usporedbi s KS-MMS. Adipogeni geni su lipoproteinska lipaza (LPL) i peroksisomski proliferator-aktivirajući receptor- γ (PPAR γ), osteogeni geni su alkalna fosfataza (ALP) i osteokalcin (OC), a hondrogeni geni su kolagen tipa II α 1 (COL2A1) i agrekan (AGN). Genska ekspresija je analizirana na početku kultivacije (d0 – 0. dan) i nakon 3 tjedna (d21 – 21. dan). Razina ekspresije je normalizirana prema ekspresiji glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), a rezultati prikazani kao omjer analiziranog gena u odnosu na GAPDH upotrebom formule $2^{-\Delta CT}$ ($\times 100$). Vrijednosti su srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * $P < 0.05$ u odnosu na KS-MMS.

4.7. Hondrogeni potencijal

Hondrogeni potencijal T-MMS utvrđen je pomoću *pellet* kultura diferenciranih u mediju s dodatkom deksametazona, askorbične kiseline, natrij-piruvata, L-prolina, ITS-Premixa i rekombinantnog humanog TGF- β 3. Kontrolni uzorci bili su *pelleti* T-MMS kultivirani u ekspanzijskom mediju. Nakon 3 tjedna diferencijacije bojenjem hondrogeno-induciranih T-MMS pomoću Alcian Blue boje potvrđena je akumulacija sulfatiranih proteoglikana, dok se histološki prerezi T-MMS kultiviranih u ekspanzijskom mediju nisu obojili (**slika 7., podslika 4.**). Ekspresija mRNA za hrskavično-specifične gene AGN, COL9 i COL2A1 utvrđena je metodom RT-PCR 14. i 21. dana hondrogene indukcije kod svih induciranih kultura (**slika 8.**). Slično osteogenim biljezima, kvantitativna PCR analiza pokazala je manju razinu ekspresije hondrogenih biljega AGN i COL2A1 kod T-MMS u odnosu na KS-MMS (**slika 9.**). U kontrolnim kulturama *pelleta* nije zabilježena ekspresija niti jednog od analiziranih hrskavičnih biljega: COL2A1, COL9, kao niti AGN biljega.

4.8. *In vitro* indukcija diferencijacije je specifična za staničnu lozu

Da bi se pokazala specifičnost diferencijacije u pojedinu staničnu lozu, monokulture adipogeneze i osteogeneze (kulture hondrogeneze nisu analizirane zbog specifičnosti *pellet* modela) križno su obojene pomoću Oil red O, Alcian blue i Alizarin red S. Bojenju su prethodili odgovarajući fiksacijski protokoli. Kulture su bile pozitivne samo na bojenja specifična za željenu lozu, dok su ostala bojenja bila negativna, čime je potvrđeno da je diferencijacija specifična za pojedine induksijske medije.

Kako bi se dodatno potvrdilo da se subpopulacije T-MMS mogu inducirati samo kod ciljane loze diferenciranih stanica u skladu s provedenim *in vitro* pokusima, kod svih je analiziranih uzoraka diferenciranih T-MMS provedena križna RT-PCR analiza mRNA na ekspresiju gena drugih staničnih loza. Niti u osteogeno niti u hondrogeno niti u adipogeno induciranim T-MMS nije otkrivena ekspresija gena drugih diferenciranih staničnih loza.

5. RASPRAVA

Zbog njihove jednostavne izolacije, brze proliferacije u staničnoj kulturi, sposobnosti samoobnavljanja, povoljnih imunih svojstava i sposobnosti diferencijacije u više staničnih loza smatra se da će primjena MMS značajno utjecati na razvoj najnovijih medicinskih grana poput stanične terapije i regenerativne medicine. Brojna pretklinička i klinička ispitivanja ukazala su na terapijski potencijal MMS, uključujući liječenje bolesti miokarda, fibroze pluća, oštećenja kralježnice te reparaciju dijelova lokomotornog sustava^{16,57,84}.

Danas se za istraživačke i terapijske svrhe MMS najčešće izoliraju iz koštane srži^{66,68}. Aspiracija i biopsija koštane srži rutinski su bolnički zahvati, pa se puna koštana srž, kao i MMS izolirane iz srži najčešće upotrebljavaju u kliničkim protokolima. Ipak, aspiracija i biopsija koštane srži su invazivni zahvati koji prate određene komplikacije i rizici poput krvarenja, boli, infekcije, pucanja aspiracijske igle, anafilaktične reakcije i fraktura³⁹. Također, broj MMS u koštanoj srži, njihova brzina rasta u kulturi i diferencijacijski potencijal smanjuju se s povećanjem dobi davatelja¹². S obzirom na to da diferencijacijski i ekspanzijski kapacitet MMS opada s fiziološkim starenjem, razumljivo je da je pronalaženje alternativnih te mlađih izvora MMS jedan od glavnih interesa istraživača koji se bave staničnom terapijom⁴⁰.

Idealan izvor MMS za kliničku primjenu trebao bi odmah biti dostupan, do njega bi se trebalo doći upotrebom neinvazivnih zahvata, a ekspanzijom bi se omogućio

dovoljan broj MMS za terapijsku primjenu. U nedostatku takvog izvora, prikladna alternativa MMS podrijetlom iz koštane srži mogla bi biti tkiva koja se inače odbacuju kao višak nakon kirurških zahvata.

Izolacija MMS iz humanih nepčanih tonzila dosad nije pokušana ili opisana u literaturi. Tonzilektomija je kirurški zahvat kojim se odstranjuju obje nepčane tonzile i čini oko 15% ukupnih otorinolaringoloških zahvata. To je najčešći kirurški zahvat u djece i jedan od deset najčešćih kirurških zahvata u odraslih⁸¹. S obzirom na iznimno visok broj tonzilektomija nepčane tonzile predstavljaju opsežnu količinu rezidualnog kirurškog materijala podrijetlom od osoba mlađe životne dobi. Kao alternativa KS-MMS, koje se danas za eksperimentalna istraživanja uglavnom izoliraju iz koštane srži starijih bolesnika nakon ortopedskih zahvata, nepčane tonzile bi mogle biti izvor tkiva za izolaciju mladih MMS s velikim potencijalom umnožavanja. Zahvaljujući dostupnosti – kako u smislu kirurškog pristupa i broju ukupnih operacija, tako i u nedostatku etičkih dvojba s obzirom na to da se radi o rutinskom bolničkom zahvatu – ljudske nepčane tonzile bi se mogle iskoristiti kao privlačan izvor mezenhimskih progenitorskih stanica za bazična istraživanja i buduću kliničku primjenu.

Ovo istraživanje pokazalo je da se multipotentna populacija mezenhimskih progenitorskih stanica – koju smo nazvali T-MMS – može uspješno izolirati iz ljudskih nepčanih tonzila. Specifični ciljevi doktorske disertacije bili su: (1) utvrditi postojanje MMS u nepčanim tonzilama, definirati protokole izolacije, karakterizirati specifične biljege na tim stanicama i ispitati njihovu sposobnost diferencijacije u tkiva

mezodermalnog podrijetla (hrskavično, koštano i masno); te (2) usporediti značajke, biljege i diferencijacijski potencijal MMS iz tonzila s dobro poznatom i karakteriziranom populacijom MMS podrijetlom iz koštane srži.

Upotrebom standardnih tehnika stanične kulture uspješno su izolirane i *in vitro* umnožene T-MMS. Za koštanu srž dvije najčešće upotrebljavane metode izolacije MMS su izolacija metodom direktne adherencije (engl. *direct plating method*) i izolacija mononuklearnih stanica pomoću gradijenta gustoće Ficoll-Paque (engl. *density gradient centrifugation*)⁸². Metoda direktne adherencije zasniva se na kultiviranju aspirata koštane srži tijekom 24 sata u polistirenskim posudama za staničnu kulturu, nakon čega se stanice koje nisu prionule za dno posuda odstrane iz kulture serijskim ispiranjem pomoću FPO. Izolacija mononuklearnih stanica pomoću gradijenta gustoće Ficoll-Paque tehnički je zahtjevnija metoda koja se zasniva na uporabi Ficoll-Paque, industrijski pripravljenog kopolimera sukroze i epiklorhidrina, koja se inače primjenjuje u biološkim laboratorijima za razdvajanje krvnih stanica. Nakon centrifugiranja krvi ili koštane srži na gradijentu Ficoll-Paque u kušalicama se mogu vidjeti slijedeći slojevi, odozgo prema dolje: plazma, bijeli sloj mononuklearnih stanica (u engleskoj literaturi obično nazvan «*buffy coat*») u kojem se nalaze limfociti i monociti, sloj Ficoll-Paque otopine, a na dnu tube eritrociti i granulociti⁸⁵. U protokolima izolacije MMS, pomoću otopine Ficoll-Paque, MMS se nalaze na prijelazu *buffy coata* u niži sloj, u području koje se opisuje kao područje specifične težine 1,073 g/mL⁸². Usporedne histološke analize i RT-PCR analize genske ekspresije diferenciranih stanica nisu pronašle razliku u diferencijacijskom potencijalu MMS koje su izolirane pomoću ovih dviju različitih metoda. S tehničke strane, metoda

direktne adherencije zahtijeva manje napora i čini se da se njome može inicijalno dobiti veći broj mezenhimskih stanica (s obzirom na kraće trajanje centrifugiranja koje je u većem obimu štetno za stanice). S druge strane, pokazano je da kontaminacija kultura drugim vrstama stanica otežava učinkovitu adheziju MMS te da metoda izolacije mononuklearnih stanica pomoću gradijenta gustoće Ficoll-Paque daje puno čišće inicijalne donorske suspenzije stanica u usporedbi s metodom direktne adherencije⁸². Računajući na mogućnost veće kontaminacije kultura zbog dvojakog embrijskog podrijetla nepčanih tonzila, pri odabiru izolacijskog protokola MMS prednost je dana izolaciji pomoću gradijenta gustoće Ficoll-Paque, čijim je modifikacijama naposljetku dobiven zadovoljavajući broj i kvaliteta T-MMS.

Prvi problem u ovom istraživanju bila je epitelna kontaminacija kultura. Naime, embrijsko podrijetlo nepčanih tonzila je dvojako – dok su stroma tonzila i limfatično tkivo mezenhimskog podrijetla, epitel tonzila potječe od stanica druge škržne vreće i endodermalnog je podrijetla. Površina nepčanih tonzila nije glatka i ravna, nego je sazdana od kripta koje invaginiraju u dubinu nepčanih tonzila i u prisutnosti kronične upale (donorsko tkivo u svih je ispitanika bilo odstranjeno zbog kronične upale) često je neodvojiva od limfatičnog tkiva. Iako se mehaničkom deepitelizacijom uz pomoć skalpela uspjelo odstraniti veći dio epitela, u P0 kulturama stanica zamijećene su brojne, vrlo male (više od 10 puta manjeg promjera u odnosu na fibroblastične MMS) adherentne epiteloidne stanice poligonalne morfologije. Ipak, s obzirom na to da je do 80%-tne konfluencije stanica u kulturi i prve ekspanzije ponekad trebalo inkubirati stanice i do 3 tjedna, primijećeno je da male epiteloidne stanice brzo nestaju iz kulture sa svakom

promjenom medija (što se rutinski provodilo dva puta na tjedan), što govori da ne mogu preživjeti u ekspanzijskom mediju koji pogoduje MMS, odnosno ne mogu čvrsto prionuti za dna polistirenskih posuda i zadržati se u kulturi stanica. U pravilu bi cjelokupna populacija epiteloidnih stanica nestala iz kulture još i prije prve tripsinizacije. Inicijalna epitelna kontaminacija zamijećena u ovom radu dosad nije bila opisana prilikom izolacije MMS iz drugih tkivnih izvora. Naime, dosad poznati odrasli tkivni izvori poput koštane srži, lipoaspirata ili sinovijalne ovojnice bili su u cijelosti mezodermalnog podrijetla, a ako je donorsko tkivo sadržavalo ektodermalnu ili endodermalu osnovu, one su bile lako odvojive od mezodermalne (poput izolacije MMS iz potkožnog tkiva mekog oglavka).

Već je prije spomenuto da je većina hematopoetskih stanica neadherentna te da se kontaminacija kultura hematopoetskim stanicama brzo smanjuje čestim promjenama medija. Ipak, uz epiteloidne stanice kojima nije pogodovao ekspanzijski medij za MMS, inicijalna populacija stanica u ovom istraživanju bila je značajno kontaminirana adherentnim monocitima koji su u kulturi imali izgled okruglih stanica s velikom jezgrom. Ta je kontaminacija bila lako objašnjiva s obzirom na to da se monociti nakon izolacije pomoću gradijenta gustoće Ficoll-Paque nalaze u bijelom mononuklearnom sloju, a nepčane su tonzile limfatični organ izrazito bogat monocitima i makrofazima. Adherentni monociti isprva su predstavljali velik problem, jer je njihov broj u kulturama bio konstantan, bez obzira na česte promjene medija. Ipak, prilikom kasnijih ekspanzija stanica u nove subpopulacije (pasaže) uvidjelo se da su te stanice toliko snažno prionule (za dno posude) da niti 5-minutna tripsinizacija nije bila dovoljna za njihovo odvajanje. Nakon završene ekspanzije stanica mikroskopskim pregledom starih posuda za kulturu u

kojima se nalazila prethodna subpopulacija još uvijek bi se vidjele prionute okrugle stanice s velikom centralnom jezgrom. Nakon druge pasaže monociti se više nisu vidjeli pod faznim kontrastnim mikroskopom niti su se mogli dokazati ekspresijom mijelomonocitnog biljega CD14.

In vitro MTS-test pokazao je značajnu razliku u proliferaciji između T-MMS i KS-MMS. Inicijalno je u stanične kulture zasijan isti broj T-MMS i KS-MMS, no prosječno vrijeme udvostručenja za T-MMS bilo je 37 h u usporedbi s 58 h za KS-MMS, što T-MMS svrstava u skupinu vrlo brzo proliferirajućih stanica. Usporedbe radi, vrijeme potrebno za udvostručenje ljudskih embrijskih matičnih stanica je 36 sati⁸⁶, dok je navedeno prosječno vrijeme udvostručenja za KS-MMS oko 60 sati⁸⁷, što je potvrđeno i ovim ispitivanjem. Dakle, T-MMS predstavlja populaciju stanica koja se može brzo umnožiti za potencijalnu kliničku primjenu. Nadalje, u daljnjem je eksperimentu CFU-F test pokazao da se među 6000 inicijalno izoliranih mononuklearnih stanica iz tonzila nalazi jedna MMS, što uz ukupan broj od 3×10^9 prosječno izoliranih mononuklearnih stanica po jednoj nepčanoj tonzili predstavlja 5×10^5 raspoloživih T-MMS prije *in vitro* ekspanzije, odnosno mogućih 1×10^6 MMS koje se mogu izolirati nekoliko sati nakon obostrane tonzilektomije.

Početno velik broj i kratko vrijeme udvostručenja ovih stanica dovodi do zanimljivog zapažanja da bi se potreban terapijski broj MMS mogao brže ostvariti uporabom alternativnih izvora MMS umjesto postojećih podrijetlom iz koštane srži. Uz dotadašnje spoznaje da se među $2,5 \times 10^4$ mononuklearnih stanica koštane srži nalazi

jedna MMS^{88,89}, Horwitz i sur. su u tri bolesnika prosječno injicirali $4,3 \times 10^9$ mononuklearnih stanica koštane srži (odnosno pretpostavljenih $1,7 \times 10^5$ MMS) kojima su uspješno ublažili simptome *osteogenesis imperfecta*⁶³. Dakle, uzme li se da je za jednu terapijsku dozu potrebno približno 2×10^5 MMS, neposrednom izolacijom T-MMS nakon tonzilektomije dobio bi se broj stanica potreban za pet terapijskih doza, dok bi se nakon 12 dana u kulturi i *in vitro* ekspanzije dobio broj MMS dovoljan za 35 terapijskih doza. Ako se uzme u obzir da se nakon prve ekspanzije stanica vrijeme potrebno za 80% konfluenciju u kulturi u kasnijim subpopulacijama skraćuje na 4-5 dana te da je broj T-MMS po 80%-konfluentnoj troslojnoj posudi za kulturu stanica bio $7-10 \times 10^6$ T-MMS, lako se može izračunati da su nakon 30-ak dana T-MMS bile ekspandirane do P3 subpopulacije, odnosno umožene do broja od $2-3 \times 10^8$ MMS. Dakle, jednom tonzilektomijom i 30-dnevnom *in vitro* ekspanijom izoliranih stanica može se dobiti broj T-MMS dovoljan za više od 1000 terapijskih doza!

U slijedećem koraku primijenjeno je imunofluorescentno bojenje za analizu konfokalnim mikroskopom, te analiza protočnom citometrijom kako bi se utvrdio izražaj biljega na površini T-MMS. U dosadašnjim istraživanjima su na površini MMS pronađene brojne adhezijske molekule, proteini izvanstaničnog matriksa, citokini i receptori faktora rasta vezani uz funkciju MMS u pojedinim tkivima i njihovu interakciju sa stromom i diferenciranim stanicama u tim tkivima⁹⁰. Suvremenim tehnikama molekularne analize poput serijske analize genske ekspresije⁹¹ i *DNA microarraya*⁹² može se na površini MMS prikazati još niz različitih biljega znakovitih za zrele stanice. Za KS-MMS je utvrđeno da na površini imaju izražene CD29 (β 1-integrin), CD44

(hijaluronski receptor), CD71, CD73 (SH3 i SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH-2, endoglin), CD106 (VCAM-1), CD-117, CD166 i Stro-1¹⁶. Nažalost, do danas nije određen niti jedan površinski biljeg koji bi bio specifičan za MMS. Smatra se da MMS ne posjeduju biljege znakovite za hematopoetske i endotelne stanične linije: CD11b, CD14, CD31, CD33, CD34, CD45 i CD133⁴. Neizražaj biljega CD14, CD34 i CD45 na površini MMS danas se smatra osnovom njihova razlikovanja od hematopoetskih prekursora⁹³.

U ovom je istraživanju analiza konfokalnom mikroskopijom pokazala izražaj CD29 (β 1-integrina), CD44 (hijaluronskog receptora), CD 90 (Thy-1) i CD105 (endoglina) u obje ispitivane populacije stanica, tj. na KS-MMS i T-MMS. S druge strane, na MMS nisu nađeni hematopoetski površinski biljezi, uključujući CD14 (monocitni diferencijacijski antigen), CD34 i CD45 (leukocitni zajednički antigen). Dodatna analiza protočnom citometrijom također je potvrdila nehematopoetsku i neendotelnu narav T-MMS, što je zaključeno na temelju manjka ekspresije CD45, odnosno CD31. Dakle, analizom biljega na površini stanica pokazano je da T-MMS i KS-MMS odlikuju ista fenotipska obilježja.

Ovdje je zanimljivo napomenuti da se izražaj površinskih biljega može u manjoj mjeri razlikovati među MMS podrijetlom iz različitih donorskih tkiva. To se objašnjava različitim funkcijama donorskog tkiva i obilježjima mikrookoliša u kojima se MMS nalaze. Na primjer, MMS iz lipoaspirata – kao i KS-MMS – diferencijacijom uspješno daju sve tri mezenhimske stanične loze⁴². Te dvije populacije stanica također su vrlo slične po morfologiji i ponašanju u staničnoj kulturi. Međutim, za razliku od KS-MMS na

površini MMS iz lipoaspirata nalazi se biljeg CD49d, dok se na površini KS-MMS nalazi biljeg CD106 koji se ne može dokazati na stanicama izoliranim iz lipoaspirata⁴². Naime, izraženost CD106 na površini KS-MMS funkcijski se povezuje s hematopoezom (CD106, drugim imenom VCAM1 prema engl. *vascular cell adhesion molecule-1*, je sijaloglikoprotein koji potpomaže adheziju limfocita, monocita, eozinofila i bazofila), tako da je manjak ekspresije CD106 na površini MMS iz lipoaspirata razumljiv, jer se stanice ne nalaze u hematopoetskom tkivu.

Među najvažnijim saznanjima u istraživanju MMS sve su učestaliji dokazi o hipoimunogenim svojstvima MMS, što bi moglo imati širok utjecaj na primjenu alogених MMS i transplantaciju MMS, čak i u HLA-nekompatibilne osobe³². *In vitro* studije pokazale su da MMS suprimiraju limfocitnu reakciju, uključujući reakciju autolođnih T-stanica, alogених T-stanica te dendritskih stanica³². U kulturama pomiješaniх MMS i monocita zabilježena je smanjena koncentracija proupalnih citokina, poput IFN- γ , IL-12 i TNF- α ³⁴. Imunosupresivna svojstva MMS također su zamijećena i *in vivo*. Djouad i sur. su pokazali da se mišje alogene MMS mogu implantirati u imunokompetentnog miša gdje stvaraju alogenu kost⁹⁴. Pretpostavlja se da je hipoimunogeno obilježje MMS dijelom rezultat djelovanja topljivih citokina koje izlučuju same MMS²⁹. S druge strane, smatra se da je izostanak imunog odgovora na MMS većim dijelom posljedica neizražaja molekula MHC II. razreda na površini tih stanica. Kako su MHC proteini II. razreda potentni aloantigeni, zbog manjka tih molekula na površini MMS ne pokreće se reakcija aloreaktivnih CD4+ T-stanica⁹⁵. Na mišjem modelu je pokazano da MMS čak inhibiraju i proliferaciju T-stanica³¹.

U većini dosadašnjih studija nisu pronađene MHC molekule II. razreda na površini MMS, te je to obilježje čak navedeno kao jedno od bitnih u karakterizaciji MMS⁵⁰. U ovoj studiji je analiza protočnom citometrijom utvrdila izostanak MHC molekula II. razreda na površini T-MMS te ekspresiju MHC molekula I. razreda. Nasuprot molekulama II. razreda, izražaj MHC molekula I. razreda na stanicama je važan jer je snažna imuna reakcija usmjerena upravo protiv stanica koje nemaju molekule I. razreda. Naime, glavna funkcija NK (prema engl. *natural killer*) stanica u organizmu je da unište stanice koje nemaju izražene molekule I. razreda⁹⁶. S druge strane, MHC molekule II. razreda su snažni aloantigeni, te činjenica da MMS ne sadržavaju MHC II govori u prilog izostanku imunog odgovora na alogene MMS.

Naposlijetku i najvažnije – pokazan je multipotentni potencijal T-MMS tako što je bilo moguće potaknuti njihovu diferencijaciju u različita tkiva mezodermalnog podrijetla – kost, hrskavicu i masno tkivo. Histološka analiza adipogeno diferenciranih kultura bojenjem pomoću Oil red O jasno je pokazala adipocite s akumuliranim kapljicama masti. Histološki prerezi hrskavično diferenciranih *pelleta* bojeni pomoću Alcian Blue pokazali su nakupljanje sulfatiranih glikozaminoglikana. Kod osteogeno diferenciranih kultura T-MMS histokemijski je utvrđena povišena aktivnost enzima alkalne fosfataze i prikazana područja mineralizacije histološkim bojenjem pomoću Alizarin red S.

Nadalje, RT-PCR analizom tkivno specifičnih gena utvrđena je ekspresija LPL i PPAR γ kod adipogeno induciranih, ALP, COL1A2 i OC kod osteogeno induciranih, te COL2A1, COL9 i AGN kod hondrogeno induciranih T-MMS. Međutim *real-time* PCR analiza pokazala je nižu razinu ekspresije koštanih i hrskavičnih mRNA biljega kod osteogeno i hondrogeno induciranih T-MMS u usporedbi s KS-MMS. Za pretpostaviti je da je niža razina ekspresije pojedinih biljega rezultat visoke koncentracije upalnih citokina koji su uobičajeno prisutni u ovoj vrsti donorskog tkiva⁹⁷. Naime, u ovoj su studiji sve T-MMS izolirane iz nepčanih tonzila bolesnika kod kojih je tonzilektomija izvršena zbog kronične upale. Nepčane su tonzile važan dio imunog sustava i većinom se sastoje od tonzilarnih limfoidnih nodula. Kronična bakterijska upala u nepčanim tonzilama potiče proizvodnju lokalnih antitijela, promjenu omjera između B- i T-limfocita te proizvodnju velikih količina upalnih citokina uključujući TNF α (čimbenik tumorske nekroze- α , prema engl. *tumor necrosis factor- α*). TNF α je pluripotentni citokin koji prvenstveno izlučuju stanice imunog sustava poput makrofaga, monocita, neutrofila i T-limfocita⁹⁸. Nedavno je pokazano da dodavanje TNF α u kulturu humanih MMS suprimira osteogenu diferencijaciju proporcionalno dozi TNF α , što se izrazilo izostankom karakteristične promjene morfologije stanica iz vretenastih u kuboidne te smanjenom aktivnošću enzima alkalne fosfataze⁹⁹. Autori su također identificirali pomoću TNF- α stimulirani gen-6 (TSG-6) koji je u fiziološkom stanju neaktivan tijekom osteoblastične diferencijacije, ali u aktivnom stanju suprimira osteoblastičnu diferencijaciju potaknutu koštanim morfogenetskim proteinima i osteogenim medijem. Posljedično, što se utvrdilo pomoću RT-PCR, prekomjerna aktivnost (engl. *up-*

regulation) TSG-6 rezultirala je smanjenom ekspresijom ALP, COL1A2 i OC kod MMS kultiviranih u osteogenom mediju.

Kako bi se potvrdile navedene pretpostavke, jedan od budućih eksperimenata bit će i utvrđivanje razina upalnih citokina u kulturama T-MMS. Kao dodatni argument teoriji da su upalni citokini suprimirali diferencijacijski kapacitet T-MMS može se navesti zapažanje (potvrđeno usporednim *real-time* PCR analizama različitih subkultura T-MMS istih donora; rezultati nisu prikazani) da su T-MMS iz 5. subkulture (P5) pokazivale veći diferencijacijski potencijal u sve tri mezenhimske linije u usporedbi s 2. subkulturom (P2) istih T-MMS, što je u potpunoj suprotnosti u odnosu na KS-MMS koje pokazuju smanjenu sposobnost diferencijacije s povećanjem broja pasaža. Pretpostavka je da je učinak povećanog broja ekspanzija u kulturi dvojak – ne samo da se dodatnim ekspanzijama umanjuje kontaminacija kultura adherentnim proupalnim monocitima (što je već opisano u prethodnom dijelu rasprave), nego se čestim promjenama medija dodatno ispire i koncentracija nakupljenih proupalnih citokina u diferencijacijskim kulturama.

U zaključku, ovim je istraživanjem dokazano da stroma nepčanih tonzila sadrži MMS koje se mogu uspješno izolirati i *in vitro* umnožiti uporabom standardnih tehnika stanične kulture. Ta je populacija stanica pokazala sklonost stvaranju kolonija u kulturi, te se razmnožavala značajno brže od kontrolne populacije KS-MMS, s prosječnim vremenom umnožavanja gotovo poput embrijskih matičnih stanica. Utvrđeno je da populacija T-MMS na površini izražava iste biljege kao i KS-MMS te da ne izražava

hematopoetske i epitelne biljege. Osobito zanimljivo je i zapažanje da T-MMS na površini nemaju izražene MHC molekule II. razreda, što otvara mogućnost terapijske upotrebe alogenih T-MMS. Naposljetku, MMS podrijetlom iz nepčanih tonzila pokazale su multidiferencijacijski potencijal, tj. sposobnost pretvaranja u različita mezodermalna tkiva – koštano, hrskavično i masno tkivo – što je potvrđeno histološkim bojenjima diferenciranih kultura i molekularnom analizom gena specifičnih za pojedina tkiva.

Zbog komplikacija i rizika vezanih uz biopsiju koštane srži, te potrebe za mlađim donorskim tkivima identifikacija alternativnih izvora MMS u središtu je zanimanja istraživača koji se bave matičnim stanicama i staničnom terapijom. Uz koštanu srž, populacije MMS dosad su pronađene i u trabekularnoj kosti, periostu, sinovijalnim ovojnicama, masnom tkivu, potkožnom tkivu mekog oglavka, timusu, zubnom ligamentu, pupčanoj vrpci, krvi iz pupčane vrpce, te placenti⁶⁰. Na temelju rezultata ovoga istraživanja, ljudske nepčane tonzile mogu se uvrstiti kao još jedan alternativni izvor MMS. Prema podacima iz SAD, 1990.-ih se na godinu izvodilo više od 600.000 tonzilektomija, od toga 70% u djece. Kao alternativa KS-MMS koje se danas prvenstveno izoliraju od starijih davatelja podvrgnutih ortopedskim zahvatima, tonzile su rezidualno kirurško tkivo podrijetlom od davatelja mlađe životne dobi, te bi se se mogle iskoristiti kao izvor mladih MMS s visokim potencijalom umnožavanja. S obzirom na jednostavan kirurški pristup i izostanak etičkih dvojba oko tonzilektomije ljudske nepčane tonzile mogle bi postati prikladan i visokoiskoristiv alternativni izvor progenitorskih stanica za bazična istraživanja i terapijske primjene.

6. ZAKLJUČCI

1. Stroma nepčanih tonzila sadrži MMS koje se mogu uspješno izolirati te *in vitro* umnožiti uporabom standardnih tehnika stanične kulture.
2. T-MMS su pokazale sklonost stvaranju kolonija u kulturi te su se razmnožavale gotovo dvostruko brže od kontrolne populacije KS-MMS.
3. Populacija T-MMS na površini sadrži iste biljege kao i KS-MMS (CD29, CD44, CD 90 i CD105), te ne sadrži hematopoetske (CD14, CD34 i CD45) i epitelne biljege (CD31). Populacija T-MMS na površini nema izražene MHC molekule II. razreda, što otvara mogućnost njihove alogene terapijske uporabe.
4. MMS podrijetlom iz nepčanih tonzila posjeduju multidiferencijacijski potencijal, tj. mogućnost pretvaranja u različita mezodermalna tkiva – koštano, hrskavično i masno – što je potvrđeno histološkim i histokemijskim analizama diferenciranih kultura i molekularnom analizom gena specifičnih za pojedina tkiva.
5. Fenotipska obilježja T-MMS, osobine u staničnoj kulturi i diferencijacijska svojstva usporediva su s obilježjima dobro istraženih i karakteriziranih MMS podrijetlom iz koštane srži.
6. Ljudske nepčane tonzile su još jedan alternativni izvor MMS.

7. SAŽETAK

Mezenhimske matične stanice (MMS) su multipotentne progenitorske stanice podrijetlom od odraslih tkiva, koje imaju sposobnost diferencijacije u različita tkiva mezodermalnog podrijetla, uključujući kost, hrskavicu i masno tkivo. Danas se za istraživačke i terapijske svrhe MMS najčešće izoliraju iz koštane srži (KS-MMS), no problemi vezani uz njihovu primjenu uključuju morbiditet donorskog mjesta, malen broj izoliranih stanica za terapijske svrhe i slabljenje diferencijacijskog potencijala s povećanjem dobi davatelja. Sve navedeno razlog je potrazi za alternativnim i mlađim donorskim izvorima MMS.

U ovoj se disertaciji prvi put predstavlja i opisuje izolacija MMS iz nepčanih tonzila. Izvršena je komparativna i kvantitativna analiza adherentnih stanica iz tog tkiva, nazvana tonzilarnim MMS (T-MMS). T-MMS su uspoređene s KS-MMS, dobro istraženim i karakteriziranim tipom MMS. Analiza površinskih biljega pokazala je da T-MMS nemaju CD14, CD31, CD34 i CD45, a da izražavaju CD29, CD44, CD90 i CD105 biljege, što je karakterističan fenotip KS-MMS. Poput KS-MMS, i T-MMS je bilo moguće diferencirati u adipocite, osteocite i hondroците. Diferencijacijski potencijal T-MMS je analiziran histološkim i histokemijskim pretragama, te RT-PCR analizom ekspresije gena znakovitih za pojedina mezenhimska tkiva. Populacija stanica izoliranih iz tonzila na površini ne izražava MHC molekule II. razreda, što može omogućiti terapijsku primjenu alogених T-MMS. S obzirom na jednostavan kirurški pristup i izostanak etičkih dvojba oko tonzilektomije, ljudske nepčane tonzile mogle bi se

iskoristiti kao prikladan alternativni izvor mladih i brzo proliferirajućih progenitorskih stanica za bazična istraživanja i terapijske primjene.

8. SUMMARY

Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from palatine tonsils.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult multipotent progenitor cells that have the ability to differentiate into lineages of mesenchymal tissues including cartilage, bone and fat. They were originally isolated from bone marrow (BM-MSCs), but current challenges of clinical application of BM-MSCs include donor-site morbidity, and low cell yields associated with age-related decrease in cell number and differentiation potential, underscoring the need to identify alternative sources of MSCs.

In the present work, the presence of MSCs in tonsillar tissue is reported for the first time. We performed comparative and quantitative analyses of BM-MSCs with a subpopulation of adherent cells isolated from this lymphoid tissue, termed tonsil-derived MSCs (T-MSCs). Surface epitope analysis revealed that T-MSCs were negative for CD14, CD31, CD34 and CD45 expression and positive for CD29, CD44, CD90 and CD105 expression, a characteristic phenotype of BM-MSCs. Similar to BM-MSCs, T-MSCs could be induced to undergo adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation. Differentiation potential of T-MSCs was analyzed histologically, histochemically and by RT-PCR for the expression of lineage related marker genes. T-MSCs did not express class II MHC antigens, suggesting a potential role as a human allogeneic cell source for cell-based therapies. Thus, human palatine tonsil-derived MSCs, which are easily accessible without ethical concerns, represent an attractive

alternative source for adult progenitor cells or MSCs for basic research and future clinical applications.

9. LITERATURA

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-776.
2. Kovacic JC, Muller DW, Harvey R, Graham RM. Update on the use of stem cells for cardiac disease. *Intern Med J* 2005;35:348-356.
3. Kucia M, Reza R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005;19:1118-1127.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
5. Friedenstein AJ, Gorska JA, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267-274.
6. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop Relat Res* 1980;151:294-307.
7. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *J Cell Sci* 1986;84:139-151.
8. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadri-potential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999;14:700-709.
9. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21:429-435.
10. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3213-3218.
11. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.
12. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related

- osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999;14:1115-1122.
13. Bertram H, Mayer H, Schliephake H. Effect of donor characteristics, technique of harvesting and *in vitro* processing on culturing of human marrow stroma cells for tissue engineered growth of bone. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:524-531.
 14. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113:1161-1166.
 15. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002;30:699-704.
 16. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9-20.
 17. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67-73.
 18. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13:69-80.
 19. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Hervé P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993;82:66-76.
 20. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005;106:419-427.
 21. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:321-334.
 22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
 23. Mello MA, Tuan RS. Effects of TGF-beta1 and triiodothyronine on cartilage maturation: *in vitro* analysis using long-term high-density micromass cultures of

- chick embryonic limb mesenchymal cells. *J Orthop Res* 2006;24:2095-2105.
24. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2008;58:1377-1388.
 25. Janjanin S, Li WJ, Morgan MT, Shanti RM, Tuan RS. Mold-shaped, nanofiber scaffold-based cartilage engineering using human mesenchymal stem cells and bioreactor. *J Surg Res* 2008;149:47-56.
 26. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-428.
 27. Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS. Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res* 2001;57:394-403.
 28. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004;32:414-425.
 29. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-3843.
 30. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol* 2002;30:42-48.
 31. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722-3729.
 32. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003;5:485-489.
 33. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
 34. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105:4120-4126.
 35. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E,

- Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;105:2214-2219.
36. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107:367-372.
 37. Itescu S, Schuster MD, Kocher AA. New directions in strategies using cell therapy for heart disease. *J Mol Med* 2003;81:288-296.
 38. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr, Moseley AB, Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389-398.
 39. Goldberg C. Bone Marrow Aspiration and Biopsy; eMedicine from WebMD. <http://www.emedicine.com/med/topic2971.htm>; posljednji put pristupano: 3. listopada 2008.
 40. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res* 2008;314:1937-1944.
 41. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-1942.
 42. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
 43. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002;20:1060-1069.
 44. Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, Chiu WT. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005;23:1012-1020.
 45. Rzhzaninova AA, Gornostaeva SN, Goldshtein DV. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from human fetal thymus. *Bull Exp Biol Med* 2005;139:134-140.
 46. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal

- ligament. *Oral Dis* 2006;12:358-363.
47. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-1675.
 48. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005;23:220-229.
 49. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 2005;23:3-9.
 50. Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. *Stem Cells Dev* 2005;14:252-265.
 51. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006;13:419-425.
 52. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60:334-339.
 53. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:985-996.
 54. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-386.
 55. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.
 56. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-46.
 57. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K, Easley K. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003;407:102-118.
 58. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998;66:1272-1278.

59. Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res* 2000;52:246-255.
60. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:373-382.
61. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406-413.
62. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3464-3474.
63. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-313.
64. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002;30:215-222.
65. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 2003;17:474-476.
66. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-1441.
67. Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, Dahlke MH. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006;81:1589-1595.
68. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81:1390-1397.
69. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI, Gerson SL. LacZ and interleukin-3 expression *in vivo* after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors.

- Hum Gene Ther 1997;8:1417-1427.
70. Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, Hendricks JK, Pittenger MF, Mosca JD. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther* 2001;3:857-866.
 71. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 1999;3:267-277.
 72. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959-963.
 73. Hori Y, Nakamura T, Kimura D, Kaino K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y. Experimental study on tissue engineering of the small intestine by mesenchymal stem cell seeding. *J Surg Res* 2002;102:156-160.
 74. Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 2002;106 Suppl 1:I143-150.
 75. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003;21:420-431.
 76. Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, Page P, Wahba GM, Lotz JC, Berven S. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004;32:430-434.
 77. Nöth U, Schupp K, Heymer A, Kall S, Jakob F, Schütze N, Baumann B, Barthel T, Eulert J, Hendrich C. Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel. *Cytotherapy* 2005;7:447-455.
 78. Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 2007;23:178-187.
 79. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-770.
 80. Bluestone CD. Current indications for tonsillectomy and adenoidectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1992;155:58-64.

81. Vital and Health Statistics: Ambulatory and Inpatient Procedures in the United States, 1996. U.S. Department of Health and Human Services; Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Health Statistics, November 1998.
82. Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 2002;20:245-256.
83. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick E, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980;56:289-301.
84. Mora AL, Rojas M. Aging and lung injury repair: a role for bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2008;105:641-647.
85. de Rock E, Taylor N. An easy method of layering blood over Ficoll-Paque gradients. *J Immunol Methods* 1977;17:373-374.
86. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andäng M, Ahrlund-Richter L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003;18:1404-1409.
87. Suva D, Garavaglia G, Menetrey J, Chapuis B, Hoffmeyer P, Bernheim L, Kindler V. Non-hematopoietic human bone marrow contains longlasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004;198:110-118.
88. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995;8-18.
89. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1699-1709.
90. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000;7:358-363.
91. Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2003;21:661-669.
92. Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Han H, Kim H. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells* 2005;23:584-593.

93. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;89:1235-1249.
94. Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837-3844.
95. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2005;2:8.
96. Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF, Velardi A. Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol* 2001;8:355-359.
97. Passali D, Damiani V, Passali GC, Passali FM, Boccazzi A, Bellussi L. Structural and immunological characteristics of chronically inflamed adenotonsillar tissue in childhood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:1154-1157.
98. Nanes MS. Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 2003;321:1-15.
99. Tsukahara S, Ikeda R, Goto S, Yoshida K, Mitsumori R, Sakamoto Y, Tajima A, Yokoyama T, Toh S, Furukawa K, Inoue I. Tumour necrosis factor alpha-stimulated gene-6 inhibits osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells induced by osteogenic differentiation medium and BMP-2. *Biochem J* 2006;398:595-603.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17. srpnja 1973. u Ogulinu, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. 1991. sam započeo studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a diplomirao u rujnu 1997. s prosjekom ocjena 4,7. Za vrijeme studija bio sam demonstrator na tri Katedre, te dobitnik Sveučilišne Stipendije i Stipendije grada Zagreba.

Od svibnja 1998. do svibnja 2001. bio sam zaposlen kao znanstveni novak na Katedri za otorinolaringologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. U lipnju 2000. sam obranio magistarski rad pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivice Klapana.

U svibnju 2001. sam započeo specijalizaciju iz otorinolaringologije za Klinički bolnički centar Zagreb. Od 2005.-2007. proveo sam 15 mjeseci u National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, SAD) i George Washington University (Washington, DC, SAD) na stručnom usavršavanju i znanstvenom istraživanju mezenhimskih matičnih stanica i tkivnoga inženjerstva. Specijalistički ispit sam položio u listopadu 2007. Od srpnja 2008. nalazim se na subspecijalizaciji iz plastične kirurgije glave i vrata.

Završio sam dva poslijediplomska studija: znanstveni poslijediplomski studij iz biomedicine (1998.-2000.), te stručni poslijediplomski studij iz otorinolaringologije i maksilofacijalne kirurgije (2002.-2004.). Do sada sam sudjelovao na više od 50 znanstvenih i stručnih skupova, 10 znanstveno-istraživačkih projekata, te bio prvi autor ili koautor preko 80 znanstvenih radova ili kongresnih objava, od kojih je 15 radova citirano u *Current Contents*. Dobitnik sam više stipendija i nagrada, od kojih su u posljednjih nekoliko godina najznačajnije Fulbrightova stipendija (2005-2007), stipendija National Institutes of Health (2006), nagrada za najbolji rad 6. EUFOS-a (*European Congress of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery*, 2007), te nagrada Europskog rinološkog društva *The special prize for basic research* (2008).

Govorim engleski, njemački i talijanski jezik. Oženjen sam i otac jednog djeteta.